

TESIS DOCTORAL

MICROORGANISMOS DE LAS CUEVAS VOLCÁNICAS DE LA PALMA (ISLAS CANARIAS)

DIVERSIDAD Y POTENCIAL USO
BIOTECNOLÓGICO



Jose Luis González Pimentel | 2019

Directores: Cesáreo Sáiz Jiménez

Leonila Laiz Trobajo



***MICROORGANISMOS DE LAS CUEVAS
VOLCÁNICAS DE LA PALMA (ISLAS CANARIAS):
DIVERSIDAD Y POTENCIAL USO
BIOTECNOLÓGICO***

Memoria que presenta

José Luis González Pimentel
para optar al título de Doctor en Biotecnología

2019

**MICROORGANISMOS DE LAS CUEVAS
VOLCÁNICAS DE LA PALMA (ISLAS CANARIAS):
DIVERSIDAD Y POTENCIAL USO
BIOTECNOLÓGICO**

Visado en Sevilla, a 12 de Abril de 2019

LOS DIRECTORES



Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez
Profesor de Investigación "Ad Honorem"



Dra. D. Leonila Laiz Trobajo
Científica Titular

EL TUTOR



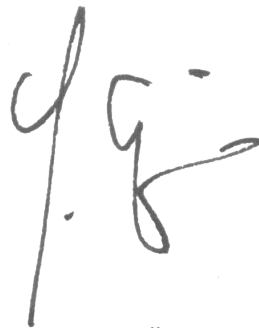
Dr. D. Fernando Manuel Govantes Romero
Profesor Titular

Memoria que presenta

D. José Luis González Pimentel
para optar al grado de Doctor en Biotecnología

DOCTOR D. José Enrique Fernández Luque, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "Microorganismos de las cuevas volcánicas de La Palma (Islas Canarias): Diversidad y potencial uso biotecnológico", presentada por D. Jose Luis González Pimentel para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y conservación de suelos, bajo la dirección de los Drs. D. Cesáreo Sáiz Jiménez y Leonila Laiz Trobajo, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.



En Sevilla, a 12 de Abril de 2019



El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto CGL2013-41674-P del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016, dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad en I+D+i.

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Cesáreo Sáiz Jiménez, a la Dra. Leonila Laiz Trobajo y, en especial, a mis compañeras la Dra. Valme Jurado Lobo, Isabel Galocha Zapata, la Dra. Irene Dominguez Moñino y el Dr. Miguel Ángel Rogerio Candellera, por la confianza depositada en mi y por toda la ayuda prestada para el desarrollo de esta tesis doctoral.

A la Dra. Ana Miller, por dirigir los muestreos. A Octavio Fernández Lorenzo, espeleólogo que nos ayudó en los accesos y permisos a los tubos de lava.

A la dirección del Parque Nacional de la Caldera del Taburiente (La Palma), por facilitarnos el acceso al tubo de lava “Cueva Honda del Bejenado”.

A la ayuda para la formación de doctores del Ministerios de Ciencia, innovación y Universidades y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por haberme permitido realizar este proyecto en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.

A Valme, por estar siempre dispuesta a ayudarme en los distintos ámbitos de la tesis doctoral. Ha sido apoyo y desahogo en incontables ocasiones.

A Isabel, que siempre que he tenido un momento de agobio me ha prestado su ayuda.

A mis padres, José Luis y Mercedes, por su apoyo incondicional en todo momento. Gracias a sus ánimos y confianza en mi, he conseguido terminar un largo proyecto de 10 años que culmina con esta tesis. A M^a Carmen, Eduardo, Chari y Manolo, por ser parte activa de mi vida.

A mi hermano, Mario, que conoce la cantidad de horas y esfuerzo que he vertido en el desarrollo de este trabajo.

A ti, Maca, a la persona que ha aguantado fines de semana en casa desde que, allá por el 2009, decidiera reencontrarme con los estudios después de tantos años en un trabajo en el que no disfrutaba. Por ayudarme en tantos y tantos momentos, por haber estado conmigo, por hacerme disfrutar la vida a tu lado. Esta tesis es también tuya.

Índice

ABSTRACT - RESUMEN	3
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	7
1.1 TUBOS DE LAVA.....	8
1.1.1 <i>Depósitos secundarios de origen biogénico</i>	10
1.2 BIODIVERSIDAD MICROBIANA Y SU PAPEL BIOGEOQUÍMICO EN LOS TUBOS DE LAVA	16
1.3 WHOLE GENOME SEQUENCING Y METAGENÓMICA FILOGENÉTICA: LA SECUENCIACIÓN MASIVA COMO IMPULSO A LA MICROBIOLOGÍA DE AMBIENTES SUBTERRÁNEOS.....	24
1.3.1 <i>El origen: Técnicas dependientes de cultivos</i>	25
1.3.2 <i>Primera revolución metodológica: Técnicas independientes de cultivo</i>	29
1.3.3 <i>Segunda revolución metodológica: Técnicas de secuenciación masiva y el desarrollo de las ciencias ómicas</i>	31
1.3.4 <i>Ómicas y estrategias de estudio: Secuenciación de genomas completos y análisis de amplicones</i>	35
1.4 OBJETIVOS	39
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
2.1 MUESTRAS ESTUDIADAS.....	42
2.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.....	46
2.2.1 <i>Aislamientos campaña 2015</i>	46
2.2.2 <i>Aislamientos campaña 2016</i>	48
2.2.3 <i>Identificación de las cepas aisladas</i>	49
2.2.4 <i>Estudios de determinación de nueva especie bacteriana</i>	57
2.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS	64
2.3.1 <i>Ensayo con bacterias</i>	64
2.3.2 <i>Ensayo con hongos</i>	67
2.4 SECUENCIACIÓN DE GENOMAS COMPLETOS	68
2.4.1 <i>Extracción del ADN genómico</i>	69
2.4.2 <i>Procesado bioinformático de las secuencias de los genomas</i>	71
2.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EN MUESTRAS NATURALES.....	76
2.5.1 <i>Extracción de ácidos nucleicos de muestras naturales</i>	76
2.5.2 <i>Preparación de genotecas de ADN y ARN</i>	79
2.6 MEDIOS DE CULTIVO	96
2.7 REACTIVOS	103
2.8 SOLUCIONES Y TAMPONES	104
CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS NO CULTIVABLES DE LOS TUBOS DE LAVA.....	109
3.1 CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADN Y ARN MEDIANTE LA TÉCNICA DE CLONACIÓN.....	110
3.1.1 <i>Genotecas de la muestra EP01-6F: Coraloides</i>	111
3.1.2 <i>Genotecas de MZ03-6F y MZ03-7G: Comparativa</i>	132
3.1.3 <i>Comparación de las genotecas de bacterias de las tres muestras analizadas</i>	158
3.2 CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA O HT-NGS	170
3.2.1 <i>Análisis taxonómico de las genotecas HT-NGS</i>	174
3.2.2 <i>Cálculo de los índices de diversidad</i>	189

CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS CULTIVABLES DE LOS TUBOS DE LAVA	193
4.1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS	194
4.1.1 Cepas aisladas del tubo de lava “Cueva del Llano de los Caños”: MZ04	195
4.1.2 Cepas aisladas del tubo de lava “Fuente de La Canaria”: MZ03.....	201
4.1.3 Cepas aisladas del tubo de lava “Búcara II de Montes Luna”: MZ26-11K	213
4.1.4 Cepas aisladas del tubo de lava “Cueva Honda del Bejenado”: EP01-6F.....	215
4.1.5 Descripción de nuevas especies bacterianas del género <i>Streptomyces</i>	218
4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS	230
CAPÍTULO 5: GENÓMICA FILOGENÉTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE NUEVAS ESPECIES: JSPECIES.....	233
5.1 SECUENCIACIÓN DE LOS GENOMAS COMPLETOS DE LAS 3 CEPAS SUSCEPTIBLES DE SER NUEVAS ESPECIES ...	234
5.1.1 Comparación de MZ0467C con las especies de <i>Streptomyces</i> más cercanas	236
5.1.2 Comparación de MZ0337C2 y MZ0348B con las especies de <i>Streptomyces</i> más cercanas.....	237
CAPÍTULO 6: GENÓMICA FUNCIONAL DE LAS NUEVAS ESPECIES DE <i>STREPTOMYCES</i>. RESISTOMA Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS ACTIVOS.....	239
6.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MZ0467C	240
6.1.1 Resistoma de MZ0467C	243
6.1.2 Producción de metabolitos secundarios en MZ0467C	248
6.2 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MZ0337C2 Y MZ0348B	257
6.2.1 Resistomas de MZ0337C2 y MZ0348B	261
6.2.2 Producción de metabolitos secundarios en MZ0337C2 y MZ0348B	263
CAPÍTULO 7: PRODUCCIÓN DE BIOCOMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIFÚNGICOS	271
7.1 NUEVAS ESPECIES DE <i>STREPTOMYCES</i> : ENSAYOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE CRECIMIENTO PARA BACTERIAS Y HONGOS.....	272
7.1.1 Capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias	272
7.1.2 Capacidad para inhibir el crecimiento de hongos	281
7.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR PARTE DEL RESTO DE <i>STREPTOMYCES</i> AISLADOS EN LOS TUBOS DE LAVA.....	283
7.2.1 Ensayos sobre otros <i>Streptomyces</i> aislados: Actividad antibacteriana	283
7.2.2 Ensayos sobre otros <i>Streptomyces</i> aislados: Actividad antifúngica.....	285
CONCLUSIONS.....	288
REFERENCIAS	290

Abstract

Subterranean environments are peculiar systems featured by specific conditions as lack of light, scarcity of nutrients and constant temperature and humidity, which perform a complex scenario for living. Lava tubes are part of these environments and differ with other subterranean formations because of their volcanic genesis. Once lava tubes have been created, microorganisms and peculiar animals colonize their walls and roofs interacting with substrate taking a relevant role in global cycles of nutrients as well as allowing for biomineralization and formation of speleothems and other biological-origin structures.

Microbial diversity of lava tubes is complex. Chemolithoautotrophic and heterotrophic communities are represented by common taxonomic groups at filum level in almost every lava tube around the world. *Proteobacteria* and *Actinobacteria* are the more abundant groups, being well known by their dynamic metabolism which has been the center of attention for researching and industry. The importance of exploring alternative sources for new antibiotics has been proposed by public healthcare in recent years due to resistance strains of bacteria. Resistance mechanisms in bacteria are ancient and widespread in microbial communities. Therefore, the study of these elements could help to design strategies to combat antibiotic resistance.

In early XX century, the discovering of penicillin supposed the start of the golden age of antibiotics, being the soil the main isolation source for used microorganisms for that purpose. At the end of past century, technologies improvements allowed the exploration of oceans increasing the options to find new microbial-based compounds. Specific conditions for life in caves and other subsurface environments along with the advance in DNA sequencing could present to these ecosystems as an important source secondary metabolites. Microbial diversity in lava tubes from Canary Islands (Spain) has never been explored thus far offering a unique opportunity to study subsurface microbiology and its potential biotechnological approach. Thus, both culture and non-culture dependent methods were implemented to describe the diversity of microorganisms in lava tube and the discovering of new species of bacterias.

Non-culture methodologies were focused on 16S and ITS markers studies using both Cloning and Next Generation Sequencing (NGS). Cloning approach was used in an initial stage through isolating the DNA/RNA from environmental samples to compare both total and metabolically active bacteria. *Proteobacteria* and *Actinobacteria* appeared as the most relevant phyla in almost all the samples studied, highlighting *Actinobacteria* in the RNA-based studies. Geographical distances among samples don't seemed to be the determinant feature for diversity differentiation, since two distant samples appeared to present more similarity in microbial diversity rather than those closer samples. NGS approach applied in a second stage of thesis increased the number of samples in the study. *Proteobacteria* was the most abundant phyla in almost all the samples except in moonmilk ones where *Actinobacteria* was the most representative group.

Culture-dependent techniques were used to contribute to microbial diversity insight as well as discovering new species of bacteria. In total, 118 bacteria were isolated and classified in the phyla *Firmicutes* (42), *Actinobacteria* (40), *Proteobacteria* (34) and *Bacteroidetes* (2). A total of 15 fungi strains were identified. The most abundant genus was *Streptomyces* with the proposal of two novel species, *Streptomyces tigoalensis* and *Streptomyces benahoarensis*. This genus is well known for its potential biotechnological use. Therefore, both *in silico* and *in vitro* assessment of the new species were carried out to test their metabolic capabilities. Genomic approaches predicted a dynamic secondary metabolism proposing the production of a wide range of biocompounds. However, antimicrobial and antifungal activities were only reported by *Streptomyces tigoalensis*. Overall, the work carried out in this thesis propose lava tubes environments being promising reservoirs of bacteria producing interesting bioactive compounds as well as it considers as relevant ecosystems for global nutrient cycles.

Resumen

Los ambientes subterráneos son sistemas singulares caracterizados por condiciones específicas como la ausencia de luz natural, escasez de nutrientes y temperatura y humedad constantes, las cuales definen un complejo escenario para el desarrollo de la vida. Los tubos de lava forman parte de estos ambientes, diferenciándose de otras formaciones subterráneas por su origen volcánico. Una

vez se ha formado el tubo de lava, los microorganismos colonizan sus paredes y techos interactuando con el sustrato, desempeñando un papel relevante en los ciclos globales de nutrientes, así como permitiendo la biomineralización y formación de espeleotemas y otras estructuras de origen biogénico.

La diversidad microbiana de los tubos de lava es compleja. Comunidades quimiolitotóxicas y heterótrofas están representadas por grupos taxonómicos a nivel de filo, comunes en la mayoría de los tubos de lava estudiados globalmente. Los grupos más abundantes son *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, filos bien conocidos por su dinamismo metabólico y que han sido el centro de atención para la ciencia e industria. En los últimos años, ha tomado relevancia la exploración de fuentes alternativas para la obtención de nuevos antibióticos debido a la aparición de bacterias multirresistentes. Los mecanismos que componen el resistoma en las bacterias son muy antiguos y extendidos entre las comunidades microbianas. Por lo tanto, el estudio de estos elementos podría ayudar a diseñar estrategias para combatir la resistencia a antibióticos.

A principios del siglo XX, el descubrimiento de la penicilina supuso el inicio de la edad de oro de los antibióticos, siendo el suelo la principal fuente de aislamiento de microorganismos utilizados para tal fin. Ya a finales del citado siglo, las mejoras tecnológicas permitieron la exploración de los océanos, aumentando las opciones de identificar nuevos compuestos bioactivos de origen microbiano. Las condiciones específicas de las cuevas y otros ambientes subterráneos, junto con los avances en materia de secuenciación del ADN, podrían definir a estos ecosistemas como una importante fuente de metabolitos secundarios. Los microorganismos de los tubos de lava de las Islas Canarias (España) no han sido explorados con anterioridad, ofreciendo una oportunidad única para estudiar la microbiología subterránea y su potencial uso biotecnológico. Así, se implementaron métodos dependiente e independiente de cultivos para describir la diversidad microbiana en los tubos de lava y el descubrimiento de nuevas especies de bacterias.

Las metodologías independientes de cultivo se centraron en los estudios de los marcadores 16S e ITS usando técnicas de clonación y secuenciación masiva de nueva generación (NGS). La clonación se utilizó inicialmente para comparar las comunidades totales y metabólicamente activas mediante el aislamiento del ADN y ARN de las muestras ambientales. Se identificaron los filos *Proteobacteria* y

Actinobacteria como los grupos más relevantes en todas las muestras estudiadas, destacando el filo *Actinobacteria* en los estudios del ARN. Las distancias geográficas entre las muestras no parecieron ser una característica determinante para la diferenciación de la diversidad, ya que dos muestras más distantes presentaron comunidades microbianas más semejantes que en otras más próximas. La aplicación de técnicas de NGS en una segunda fase de la tesis supuso el estudio de un mayor número de muestras a analizar. El filo más abundante en casi todas las muestras fue *Proteobacteria*, a excepción de las muestras de moonmilk donde *Actinobacteria* constituyó el filo más representativo.

Las técnicas dependientes de cultivo se utilizaron para contribuir al estudio de la diversidad microbiana, así como para describir nuevas especies de bacterias. Se aislaron un total de 118 bacterias, clasificadas en los filos *Firmicutes* (42), *Actinobacteria* (40), *Proteobacteria* (34) y *Bacteroidetes* (2). Un total de 15 cepas de hongos fueron igualmente identificadas. El género de bacterias más abundante fue *Streptomyces*, proponiéndose a *Streptomyces tigalatensis* y *Streptomyces benahoarensis* como nuevas especies. Se llevaron a cabo el desarrollo de ensayos in silico e in vitro de las nuevas especies bacterianas para comprobar sus habilidades metabólicas. Los análisis genómicos predijeron un sistema metabólico secundario dinámico, sugiriendo la capacidad para producir una gran cantidad de diferentes compuestos activos. Sin embargo, únicamente se pudo determinar la capacidad antibiótica y antifúngica en *Streptomyces tigalatensis*. En definitiva, el trabajo realizado en esta tesis propone a los tubos de lava como potencial reservorio de bacterias productoras de interesantes compuestos bioactivos, así como describe a estos ecosistemas como agentes relevantes en los ciclos globales de nutrientes.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 TUBOS DE LAVA

El medio subterráneo se caracteriza fundamentalmente por presentar unas condiciones ambientales muy especiales, donde la temperatura y humedad son prácticamente inalterables, hay ausencia de luz solar y una limitada entrada de nutrientes (Engel y col., 2001; Zhou y col., 2007). De esta forma, la falta de luz evita el desarrollo de productores primarios, lo cual impide la aparición de otros organismos de la cadena trófica. Por tanto, casi exclusivamente, la entrada de energía y materia se debe a intrusiones de agua de percolación a través de la roca, arrastrando los nutrientes desde la superficie hasta estos ambientes subterráneos. Cuevas, cavernas, túneles, simas y minas, son algunas de las formaciones más importantes de los distintos ambientes subterráneos, si bien su formación y evolución tienen orígenes diferentes, bien por la acción natural de procesos geológicos o por la actividad antrópica.

Más allá del interés exclusivamente material y económico que los ambientes subterráneos representados en el desarrollo de túneles y minas han tenido por parte del ser humano, las cuevas han despertado un particular interés para su estudio debido a los procesos geológicos y biológicos que tienen lugar. En primer lugar, porque los ecosistemas de las cuevas han sido considerados como laboratorios naturales para el estudio de la ecología y la evolución natural debido a la relativa simplicidad de sus comunidades y al aislamiento temporal y espacial de su biota (Poulson y White, 1969). En segundo lugar, debido a la variedad de formaciones con orígenes dispares que se localizan en el planeta. Tradicionalmente, las cuevas más comunes y, por tanto, las más estudiadas han sido las kársticas, las cuales se forman por la disolución de rocas carbonatadas (Palmer, 1991). En menor medida, las cuevas volcánicas, principalmente representadas por los tubos de lava, también han sido objeto de estudio (Wood, 1976; White, 2005). Los tubos de lava son cavidades naturales formadas por el enfriamiento diferencial de la lava. Normalmente, durante una erupción volcánica, el flujo de lava cae hacia la dirección de menor resistencia siguiendo el efecto de la gravedad. Después de un tiempo, la parte superior del flujo, en contacto directo con el exterior, comienza a solidificarse conservando en su interior el calor de la lava, la cual continúa su recorrido hasta que finaliza su drenaje dejando una estructura con forma de tubo (Jordá-Bordehore y col., 2016) (Fig. 1). Con el paso del tiempo, el propio peso

de la corteza superior de la cavidad, ocasionales temblores de tierra debido a la propia actividad sísmica y la alta probabilidad de irrupción en la cavidad de raíces de la vegetación superficial, producen el colapso del tubo de lava permitiendo la entrada de agua y materia orgánica a su interior.

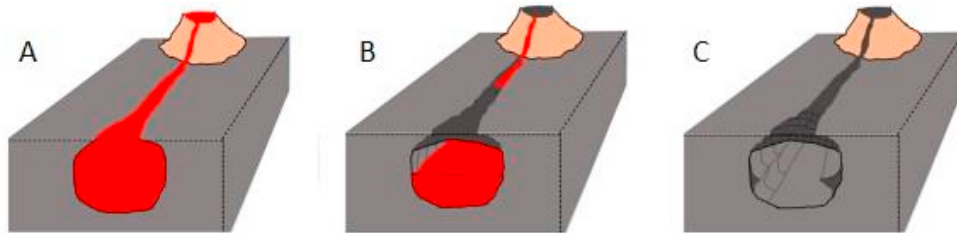


Figura 1. Esquema de la formación de un tubo de lava. En los primeros instantes de la erupción volcánica, el flujo de lava transcurre desde el respiradero del volcán en erupción beneficiándose de la canalización de la zona y de la pendiente de la colina (A). Cuando el caudal comienza a reducirse, la zona superficial de la colada se enfría formando una costra sólida, dando lugar al tubo de lava (B). Una vez la actividad volcánica ha cesado, el enfriamiento del tubo de lava y el transcurrir de los años, favorecerán la intrusión y colonización de agentes biológicos superficiales (C). Fuente: Jordá-Bordegore y colaboradores (2016).

Los tubos de lava se localizan en distintas regiones de la Tierra, de forma más intensa en aquellas áreas con una fuerte actividad volcánica. En Estados Unidos es donde se han explorado un mayor número de tubos de lava, entre otras cosas por la incesante actividad volcánica que a día de hoy se produce en las islas Hawái, pero también por las formaciones originadas de un vulcanismo ya extinto en regiones de California, Idaho, Nuevo México, Oregón y Washington (Veni, 2002). En Sudamérica han tenido cierto interés los tubos de lava presentes en las Islas Galápagos (Balazs, 1975; Jordá-Bordegore y col., 2016). En Europa, Islandia, Italia, Islas Azores e Islas Canarias presentan la mayor parte de este tipo de cavidades. En Asia, Corea del Sur, Japón, Jordania y Arabia Saudí son los países donde se pueden encontrar un mayor número de tubos de lava.

La mineralogía de los tubos de lava es muy característica debido a las condiciones de temperatura y presión, generando una variedad de rocas, siendo el basalto la más común (Woo y col., 2008). Esta es una roca de composición máfica (rica en silicatos de magnesio y hierro), con fenocristales

de olivino, augita, plagioclasa, piroxeno y clinopiroxeno, además de presentar minerales de hierro (Rogers, 1999).

1.1.1 DEPÓSITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN BIOGÉNICO

Desde el punto de vista abiótico, los depósitos o espeleotemas que se pueden observar en los tubos de lava están separados en dos categorías. Los depósitos primarios son elementos que se formaron simultáneamente en las primeras fases de la creación de los tubos de lava. En esta categoría se encuentran espeleotemas de roca volcánica primaria como las estalactitas, estalagmitas y otras formaciones derivadas del goteo y enfriamiento de la lava en el interior del tubo (Baird y col., 1985). Los depósitos secundarios, sin embargo, pueden derivarse de procesos abióticos o bióticos. Ambos se originan tras el proceso inicial de enfriamiento, formación del tubo de lava y posterior colapso de paredes y techo, permitiendo la filtración de agua y, por tanto, la entrada de materia orgánica e inorgánica de la superficie.

A pesar de la amplia distribución de los tubos de lava y otras formaciones volcánicas a lo largo del planeta, así como la intensa actividad de exploración de estos, el estudio de estos depósitos no había llamado la atención de la comunidad científica hasta fechas recientes, al contrario de lo que ocurre con los que se encuentran en las cuevas de origen kárstico. Esto se debió al poco interés que presentaban los minerales secundarios (Forti, 1994; Hill y Forti, 1997). Sin embargo, posteriormente, diversos estudios han incrementado el interés en los distintos depósitos secundarios debido a la gran cantidad de minerales observados (Hill y Forti, 1997; Forti, 2000) y a la variedad de escenarios que se han podido observar en estas formaciones con origen volcánico, dándose unas condiciones únicas para la deposición mineral (Forti, 2005).

Los minerales primarios asentados en el tubo de lava tras el enfriamiento inicial, tras el colapso y entrada de agentes externos, sufren reacciones fisicoquímicas que dan a lugar a los minerales secundarios. Las reacciones de disolución/precipitación, redox, ácido-base, transiciones de fase, así como hidratación/deshidratación son las más comunes dentro de los procesos abióticos que favorecen la aparición de minerales secundarios, mientras que la actividad de los microorganismos arrastrados,

principalmente, por la percolación del agua exterior es la principal causa de formación de minerales secundarios de origen biótico (Onac, 2012).

La colonización de las cuevas por parte de los microorganismos es un proceso natural que ha favorecido la interacción entre estos y el medio, que en ocasiones dispone de unas condiciones de vida extremas que fuerzan a bacterias, arqueas y hongos a adaptar su metabolismo para la supervivencia (Barton y Jurado, 2007).

De este modo aparece el término “Geomicrobiología”, cuyo objeto de estudio de la interacción entre los microorganismos y los sustratos geológicos (Cockell, 2010), debido a la capacidad de determinados microorganismos para metabolizar minerales y de este modo, obtener energía. Son los llamados quimiolitóautótrofos, comprobándose que son los responsables de numerosos procesos biogeoquímicos producidos en las cuevas y también en los tubos de lava (Barton, 2006). Estos microorganismos tienen una importancia vital dentro de la cadena trófica de estos nichos subterráneos, ya que, según algunos autores, podrían actuar como productores primarios, soportando el desarrollo de microorganismos heterótrofos, lo que junto con la entrada de nutrientes del exterior a través del agua de percolación y la intrusión de raíces de plantas situadas en la superficie, aportan las condiciones nutricionales necesarias para su viabilidad en las cuevas (Sarbu y col., 1996; Saiz-Jimenez y Hermosin, 1999; Hose y col., 2000; Jobbagy y Jackson, 2001; Schenk y Jackson, 2002; McCulley y col., 2004). Igualmente cabría destacar la presencia de azufre, carbón orgánico y nitrógeno asociados con la composición química de los sustratos basálticos en los tubos de lava (Hathaway y col., 2014; Sneider, 2010), lo cual favorece la presencia de microorganismos oxidantes y reductores del azufre y nitrógeno. Dentro de algunos sectores de la comunidad científica se ha promovido el uso de una subcategoría dentro de la *Geomicrobiología*, y es la *Geomicología*, que se define como el impacto de los hongos sobre los procesos geológicos, incluyendo la alteración y erosión de las rocas y minerales, la acumulación de metales, su papel en el ciclo de nutrientes e influencia en la proliferación de comunidades microbianas en los sustratos minerales (Burford y col., 2003).

Estos procesos de adaptación metabólica de los microorganismos debido a unas condiciones muy concretas, dificultan su cultivo en

laboratorio, lo cual ha promovido el uso de técnicas moleculares para conseguir un conocimiento completo de la biodiversidad de ambientes subterráneos y de grupos de microorganismos desconocidos hasta la introducción de dichas técnicas (Saiz-Jimenez, 2012). La combinación de técnicas microbiológicas, de biología molecular y geoquímicas, ha permitido un amplio desarrollo de la *Geomicrobiología*, alcanzando un mayor conocimiento de las comunidades microbianas y sus interacciones intra- e interespecíficas en la deposición de espeleotemas de minerales secundarios (Gabriel y Northup, 2013). Además, no hay que olvidar el interés que la producción de metabolitos de alto valor biotecnológico tiene para el ser humano (Cheeptham y col., 2013).

El proceso por el cual organismo y mineral primario interactúan dando lugar a depósitos o espeleotemas secundarios se denomina biomineralización (Bäuerlein, 2004), y en estos procesos pueden intervenir eucariotas pluricelulares, como animales y vegetales, pero la intervención proviene principalmente de procariotas (Simkiss y Wilbur, 1989). Diferentes autores han descrito dos mecanismos distintos para los procesos de biomineralización: la mineralización controlada biológicamente (Bazylinski y Frankel, 2003) y la mineralización inducida biológicamente (Lowenstam, 1981).

La mineralización controlada biológicamente es propia de organismos superiores, ya que engloba endo- y exoesqueletos o cáscaras de huevos, entre otros. En este mecanismo la cristalización sucede de forma ordenada (Miller y col., 2013) y es el organismo quien controla el crecimiento del mineral a través del proceso de nucleación y, por tanto, el tamaño, composición, hábito y localización final del mineral (Bazylinski y Frankel, 2003; Mann, 2001).

La mineralización inducida biológicamente siempre sucede en el exterior del organismo implicado, estando condicionada por el entorno donde se produce dicho mecanismo, es decir, un mismo organismo puede estar especializado en la mineralización de depósitos según las condiciones fisicoquímicas de los minerales primarios disponibles (Lowenstam y Weiner, 1989). Se puede decir que es un mecanismo indirecto derivado de unas exigencias bioquímicas primarias del o de los organismos en cuestión. En este caso, los minerales siguen una disposición amorfa con una amplia distribución de tamaños de partículas (Miller y col., 2013). Este mecanismo

es propio de procariotas, hongos y otros eucariotas unicelulares, así como de ciertas algas, pero ha sido especialmente documentado en grupos taxonómicos concretos de bacterias localizados en diferentes ambientes (Pérez-González y col., 2010).

En las cuevas los eventos de precipitación y disolución pueden dar lugar a depósitos de carbonatos, silicatos, óxidos de hierro y manganeso, compuestos derivados de la oxidación/reducción del azufre y nitratos. El papel de los microorganismos en dichos procesos puede ser pasivo o activo, dependiendo de si la célula sirve como punto de nucleación o de si, de forma intencionada, sintetizan enzimas que inducen la mineralización, respectivamente (Northup y Lavoie, 2001). La participación pasiva por parte de los microorganismos sería suficiente para la formación de minerales, sin embargo, la evolución metabólica de ciertos microorganismos ha incentivado la biomineralización biótica a través de procesos que enmarcan la excreción de ácidos inorgánicos y orgánicos, de solventes orgánicos o el estrés salino derivado de las reacciones metabólicas de los microorganismos cuyos productos finales son aniones que reaccionan con los componentes catiónicos del sustrato formando sales muy solubles en agua. Si se dan momentos de escasez de agua en el sistema, se produce la precipitación de las sales en forma de cristal. Por último, la formación de biofilms y la secreción de exoenzimas tienen un papel importante en los procesos de biomineralización. Los microorganismos producen exopolímeros, que dan lugar a los biofilms, y contienen grupos iónicos que, junto con los productos promovidos por la actividad metabólica, agravan la erosión del sustrato mineral. Además, estos biofilms suponen una pantalla protectora ante condiciones ambientales adversas y/o nutricionales, favoreciendo un microhábitat para los microorganismos que se desarrollan dentro de estos films poliméricos. Las exoenzimas son producidas por parte de los microorganismos para degradar ciertos compuestos insolubles, de manera que queden biodisponibles (Sand, 1997).

1.1.1.1 MOONMILK

Los depósitos o espeleotemas secundarios conocidos como moonmilk son exclusivos de ambientes subterráneos y tienen una composición basada en carbonatos. No obstante, su denominación no queda sujeta a una

terminología mineralógica, sino textural (Curry y col., 2009; White, 2010), ya que hace referencia a agregados minerales de aspecto pastoso, fácil deformidad y untuosidad, pero con diferentes composiciones minerales y génesis (Baskar y col., 2011). Aunque ha sido tradicionalmente observado en cuevas kársticas, no es extraño hallar este tipo de formaciones en los tubos de lava (Polyak y Provencio, 2006). Los principales carbonatos del moonmilk son la calcita, hidromagnesita, aragonito, vaterita y huntita (Cuezva y col., 2003), siendo la primera la más abundante en los tubos de lava (White, 2010). Es común encontrar con cierta frecuencia trazas de nitratos y sulfatos formando parte de estas estructuras (Martínez-Arkarazo y col., 2007).

1.1.1.2 MUCOLITOS

Los mucolitos son formaciones o espeleotemas con morfología similar a las estalactitas propias de ambientes subterráneos. Se diferencian de estas, y de hecho se han descrito como pseudo-estalactitas, por su apariencia mucosa y tacto viscoso y pueden presentar distintas coloraciones amarillas, marrones o negras, por destacar las más abundantes. Previamente se han descrito este tipo de formaciones en tubos de lava, donde se pudieron apreciar biofilms bacterianos asociados a estas formaciones (Hathaway y col., 2014; De los Ríos y col., 2011; White, 2010). De hecho, durante su generación se llevan a cabo distintos procesos que tienen en común la fuerte presencia de materia orgánica producida durante los procesos de oxidación involucrados en el ciclo del azufre y del hierro, en los cuales las distintas comunidades de microorganismos parecen tener un peso específico en el desarrollo de estas pseudo-estalactitas (Onac y Forti, 2011; De los Ríos y col., 2011). Su composición no sólo se limita a este tipo de elementos, ya que se han podido estudiar mucolitos con abundante presencia de calcita (Miller y col., 2016). De este modo, conforme pasa el tiempo los productos derivados de estas reacciones pueden cristalizar, generando diferentes tipos de minerales. Así pues, los mucolitos pueden aparecer, según se ha descrito, como resultado directo de los procesos redox, pero otras reacciones de doble sustitución entre el ácido sulfúrico y los sedimentos presentes en las cuevas pueden generar este tipo de formaciones (Onac y Forti, 2011).

La proximidad entre cavidades y la superficie puede favorecer la intrusión de raíces que funcionaría de centro de nucleación para el desarrollo

de pseudo-estalactitas, entre las que se pueden encontrar mucolitos de filossilicatos como la haloisita y allofanita, donde tanto la actividad bacteriana como fúngica podría desempeñar un rol relevante en su mineralización (Daza y Bustillo, 2014).

1.1.1.3 PRINCIPALES SILICATOS

Los silicatos representan la tercera parte de los minerales presentes en el planeta. Uno de los minerales más extendidos en los tubos de lava es el ópalo, normalmente presentes en formaciones denominadas coraloides, mientras que también es muy común encontrar minerales de la arcilla.

Las arcillas aparecen en los ambientes subterráneos formando parte de las paredes, suelos y techos, como fruto de los residuos de corrosión y dando forma a las vermiculaciones. Ricas en hierro, las arcillas pueden contener bolsas anaeróbicas y así retener y neutralizar productos metabólicos de desecho. Todos estos factores pueden favorecer la colonización microbológica (Northup y Lavoie, 2001; Díaz-Herraiz y col., 2013). Konhauser y Urrutia (1999) mostraron que las superficies microbianas iniciaban la biomineralización de metales a bajas concentraciones seguidas de formaciones autocatalíticas de arcillas silicatadas de hierro y aluminio en estudios experimentales y en el medio natural.

Los coraloides son una de las formaciones de silicatos más comúnmente observadas tanto en cuevas kársticas como en tubos de lava (Hill and Forti 1997; Miller y col., 2016b). Se definen como espeleotemas nodulares, globulares, de aspecto botroidal o similar a formaciones coralinas, con coloraciones que van desde el blanco hasta el marrón oscuro, pasando por amarillo y gris. Su mineralogía ha sido descrita como partículas de silicio de morfología amorfa e hidratada, principalmente ópalo-A (Vidal Romaní y col., 2010; Miller y col., 2016), cuyo origen parece provenir de la actividad metabólica de los microorganismos (Urbani y col., 2005; Aubrecht y col., 2008; Miller y col., 2014). Banks y colaboradores (2010) implicaban a las células bacterianas en el proceso de formación de coraloides con carbonato cálcico de forma pasiva, es decir, actuando como punto de nucleación del mecanismo de mineralización, depositándose los cristales de CaCO_3 en la superficie celular de la bacteria favoreciendo la captura de las células

durante el proceso de formación. Sin embargo, es en los coraloides compuestos por ópalo-A donde los microorganismos parecen tener una incidencia activa en la formación de los minerales. De hecho, la presencia de minerales de la arcilla parece favorecer la activación metabólica de los microorganismos (Tazaki, 2005; Gadd y col., 2012).

1.2 DIVERSIDAD MICROBIANA Y SU PAPEL BIOGEOQUÍMICO EN LOS TUBOS DE LAVA

Los microorganismos están ampliamente distribuidos a lo largo del planeta, localizándose incluso en áreas con unas condiciones realmente extremas que, en principio, harían inviable el desarrollo de vida, como las fumarolas oceánicas (Connelly, 2012), ambientes hipersalinos (Oren, 2006) o extremadamente ácidos (Macalady, 2007). Debido a la facilidad de adaptación de los microorganismos, Baas-Becking (1934) lanzó la hipótesis “cualquier cosa está en cualquier lugar, pero el medio selecciona”, que posteriormente fue aplicada a la geografía microbiana (Hortal, 2011; Fontaneto y Hortal, 2012).

La colonización de cuevas y tubos de lava viene determinada por las características físicas, químicas y ambientales de las diferentes zonas de estos ambientes subterráneos, ya que los microorganismos con necesidades metabólicas más complejas se situarán en zonas más próximas a la superficie, con una mayor frecuencia y abundancia de nutrientes y otros elementos que favorecen la colonización. Generalmente, son nichos donde abundan los microorganismos heterótrofos. Sin embargo, en zonas más profundas y/o alejadas de la superficie, el acceso a los nutrientes por parte de bacterias, arqueas y hongos es más complicado, favoreciendo la colonización de microorganismos quimiolitóautótrofos debido a la presencia de minerales redox activos. A este nivel se han podido encontrar microorganismos que son capaces de utilizar el azufre, hierro y manganeso (Northup y col., 2003; Macalady y col. 2008; Chen y col., 2009; Carmichael y col., 2013), así como aquellos que participan de forma relevante en los ciclos del nitrógeno y carbono (De Mandal y col., 2017; Zhao y col., 2017).

En determinados escenarios, los microorganismos se ven obligados a establecer relaciones de mutualismo, donde los productos generados por una especie sirven para el metabolismo de otra, y a su vez el resultado metabólico de ésta, ayuda a la primera a colmar exigencias nutricionales que no se verían resueltas sin la presencia de la segunda en el nicho ecológico (Barton y Jurado, 2007). Pero también existen interacciones en forma de comensalismo, donde una comunidad microbiana se alimenta de aquellos metabolitos que resultan de la actividad metabólica de otra comunidad, sin que a ésta le afecte o perjudique este hecho.

Los microorganismos presentes en tubos de lava provienen de comunidades que residen en la superficie, y tras los procesos descritos de fractura y percolación, llegan a estos ambientes subterráneos donde solo aquellos con un metabolismo más flexible o adecuado son capaces de establecerse definitivamente en el sustrato. De este modo, Lavoie y colaboradores (2017), observaron que, al comparar las comunidades microbianas de los tubos de lava y las del suelo superficial se reproducían los mismos grupos taxonómicos a nivel de filo en ambos escenarios. Sin embargo, entre ambos solo compartían un 11,2% de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Los OTUs fueron definidos originalmente por Sneath y sokal (1973) como aquellos objetos, individuos, estirpes o especies, así como agrupaciones o clases que quedan sujetos a examen. De esta forma, las comunidades presentes en un nicho ecológico pueden ser agrupadas y clasificadas para poder llevar a cabo su identificación y, por tanto, el estudio de la diversidad. Existe una amplia diversidad microbiana en ambientes subterráneos, que comprende una gran cantidad de miembros de filos bacterianos, siendo *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi* y *Chlorobi/Bacteroidetes* los grupos más abundantes (Lee y col., 2012). Sin embargo, aparecen dos grupos dominantes, que se alternan la primera y segunda posición, según los distintos estudios basados en el análisis del ADN para conocer la diversidad en tubos de lava: *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Hathaway y col., 2014; Riquelme y col., 2015a; Lavoie y col., 2017).

El filo *Proteobacteria* es la división filogenéticamente más diversa de los procariotas, y se presentan como el grupo más importante en los ambientes subterráneos, junto con el filo *Actinobacteria*. Además, este grupo ha suscitado un interés notable en el área de las ciencias de la salud por

agrupar a especies patógenas asociadas a numerosas enfermedades en los seres humanos. Entre los géneros más conocidos y estudiados en esta área se encuentran *Escherichia* y *Helicobacter*. De igual forma, en este grupo se incluyen bacterias patógenas de animales y plantas. De metabolismo muy versátil, el éxito de las proteobacterias a la hora de colonizar ambientes subterráneos podría ser atribuido, entre otros, a la capacidad para biodegradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, así como a la capacidad por parte de algunos de sus miembros de fijar el carbono atmosférico y transformar el nitrógeno (Tomczyk-Zak y Zielenkiewicz, 2015; De Mandal y col., 2017). Además, se ha observado su presencia y elevada abundancia en las distintas formaciones de minerales secundarios en diferentes cuevas y tubos de lava, que podría relacionarse con la capacidad de precipitar carbonatos por parte de *Myxococcus* spp. y *Pseudomonas* spp. En espeleotemas se han podido observar especies del filo *Proteobacteria* con un papel destacado dentro de la comunidad microbiana (Dhami y col., 2018). Además, la diversidad metabólica que poseen los distintos grupos de este filo ha permitido determinar el papel de las proteobacterias en ambientes extremos, como en los procesos de formación de las cuevas ácidas de Frasassi y Acquasanta (Italia), donde el género *Acidithiobacillus*, autótrofo que puede oxidar el sulfuro de hidrógeno a ácido sulfúrico, dominó la comunidad de microorganismos presentes en las *snottites*. Las *snottites* son biofilms pendulares o colgantes, con un pH de entre 0 y 2, que se localizan en las paredes y techos de cavidades ricas en sulfuro de hidrógeno. De esta forma, se ha llegado a considerar que la actividad microbiana causante de estos biofilms acelera la formación de la cavidad (Jones y col., 2012, 2014).

Igualmente, la creciente preocupación de los últimos años debida al desarrollo de mecanismos de resistencia a antimicrobianos en los microorganismos, ha despertado el interés de la comunidad científica en el estudio de ambientes prístinos o poco alterados por el hombre, entre los que se incluyen las cuevas, para analizar la resistencia de los microorganismos a antibióticos y otros fármacos comúnmente usados. De esta forma, Bhullar y colaboradores (2012), observaron la capacidad de desarrollar estos mecanismos de resistencia por parte de proteobacterias, específicamente cepas aisladas de las clases *Alfa*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria*, seguidas por *Actinobacteria* y en un lugar más secundario, *Firmicutes* y otros grupos con bajo contenido en G+C. Como resultado de dicho estudio se determinó que diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos se encontraban

presentes en los genomas de las bacterias de forma natural desde tiempos ancestrales, haciendo más fácil a los microorganismos adaptar sus mecanismos de resistencia a la exposición de antibióticos utilizados por la medicina moderna. Este hecho permitiría descubrir nuevas rutas metabólicas y mecanismos de resistencia alternativos que podrían ayudar a encontrar soluciones en la lucha contra patógenos multirresistentes. Este filo se ha visto tradicionalmente capaz de producir una importante cantidad de compuestos bioactivos, despertando el interés de múltiples áreas como la farmacológica, en el desarrollo de terapias contra el cáncer, o el desarrollo de otros compuestos como antibióticos o antifúngicos (Mander y Lui, 2010). Pero también en el área industrial y ambiental, puesto que ciertos miembros de este grupo taxonómico han sido utilizados con frecuencia en estudios de degradación de compuestos derivados del petróleo, debido a su capacidad de utilizar fuentes de carbono complejas para la obtención de energía (Broojimans y col., 2009).

Junto con el filo *Proteobacteria*, *Actinobacteria* representan el grupo más abundante observado en cuevas, especialmente en los tubos de lava (Hathaway y col., 2014; Riquelme y col., 2015a; Riquelme y col., 2015b; Lavoie y col., 2017). Las actinobacterias aparecen de forma muy común en suelos, siendo un grupo ecológicamente muy representativo, que desempeña un papel destacable en los ciclos biogeoquímicos y procesos de biomineralización, favoreciendo la disolución de minerales o la precipitación de minerales secundarios (Cuezva y col., 2012; Miller y col., 2014). Igualmente, estas bacterias se han asociado al biodeterioro del arte rupestre presente en las cuevas de Tito Bustillo, Altamira y La Garma (Schabereiter-Gutner y col., 2002a-b, 2004), y a los procesos de degradación de tumbas etruscas (Díaz-Herraiz y col. 2013, 2014).

Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas entre las que se encuentra algunos de los patógenos más agresivos para el ser humano o las plantas, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae* o *Nocardia farcinica*, para los primeros, o *Streptomyces scabies*, *Leifsonia xyli*, para las segundas. Al mismo tiempo, engloba algunos géneros como *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardia* o *Salinispora* con un elevado número de especies capaces de producir antibióticos y otros productos relacionados con la salud, como antitumorales (Kumari y col., 2016; Bhim y col., 2018), o con la agricultura (Kariminik y

Baniasadi, 2010). Inicialmente el género *Amycolatopsis* se integraba dentro de *Streptomyces*, posteriormente fue cambiado a *Nocardia*, para finalmente crear su propio grupo donde se incluyen aquellas especies que no presentan ácidos micólicos en sus paredes celulares (Lechevalier y col., 1986). Por su parte, el género *Streptomyces* es el grupo más estudiado debido a su elevada capacidad de producir compuestos bioactivos. Inicialmente, el interés en este género se centró en el descubrimiento de antibióticos, siendo entre la década de los años 40 y 60 del siglo XX cuando más productividad se obtuvo (Watve y col., 2001). Kharat y colaboradores (2009) estimaron que el 80% de los antibióticos existentes hasta la fecha derivaban de distintas especies de *Streptomyces*. Por lo tanto, una de las mayores tareas de investigación de los últimos años es desarrollar y mejorar las técnicas destinadas al aislamiento y obtención de los compuestos producidos por *Streptomyces* spp. (Ingh y col., 2008).

Desde que en 1943 Waskman descubriera la estreptomicina, las actinobacterias han sido ampliamente estudiadas. Inicialmente los estudios se centraron en las bacterias presentes en suelos, posteriormente las presentes en los océanos, y más recientemente, en ambientes subterráneos (Schatz y col., 1944; Burg y col., 1979; Solanki y col., 2008; Riquelme y col., 2017). Este interés podría resultar en el descubrimiento de miles de moléculas y sustancias bioactivas producidas por su metabolismo secundario, que podrían tener un importante valor desde un punto de vista biotecnológico (Jurado y col. 2010a). De hecho, diversos estudios en los últimos años han discutido el gran potencial de las bacterias aisladas de ambientes subterráneos para la obtención de compuestos bioactivos (Nakaew y col., 2009; Bhullar y col., 2012; Cheeptham y col., 2013; Yasir, 2018), así como los desafíos que se presentan para los investigadores al realizar estos estudios, debido principalmente a las dificultades de acceso a las cavidades, recolección y conservación de las muestras y, lo más importante, crecimiento de los microorganismos en el laboratorio, condiciones para la producción de los compuestos y configuración de fermentación (Soumya y col., 2017).

Dentro del filo *Nitrospirae* se encuentran miembros con un papel fundamental en los procesos biogeoquímicos de las cuevas, ya que son organismos quimiolitautótrofos obligados, los cuales llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción para la obtención de energía. Es decir, han

desarrollado un sistema metabólico caracterizado por la fijación de CO₂ y la oxidación de nitritos o hierro, al igual que distintos grupos disponen de la capacidad de reducir sulfatos de forma anaerobia (Sarbu y col., 1996; Pohlman y col., 1997). Debido a estos exigentes requerimientos nutricionales, solo unos pocos microorganismos pertenecientes a este filo han podido ser caracterizados hasta la fecha (Tomczyk-Zak y Zielenkiewicz, 2015). Especialmente abundantes en minas con pH ácido (Schrenk y col. 1998), su presencia es común en cuevas kársticas (Northup y col., 2003; Oliveira y col., 2017), mientras que, si bien su representatividad en tubos de lava no alcanza los niveles observados para los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, su presencia habitual y su moderada abundancia, sitúan al filo *Nitrospirae* entre los grupos importantes de las cuevas volcánicas (Lavoie, 2017; Hathaway y col. 2014; Northup y col. 2011).

Firmicutes es el principal filo de bacterias, comprendiendo más de 250 géneros, incluyendo *Bacillus*, *Lactobacillus* o *Streptococcus* y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Aunque su presencia es común en cuevas kársticas y tubos de lava, su representación suele ser bastante baja. Tienen un metabolismo versátil que les ha permitido adaptarse a condiciones de extrema acidez (Macalady et al, 2007). También, algunos miembros de este filo son capaces de esporular en condiciones de estrés por escasez de nutrientes o deshidratación (Cote y col., 2015). Su papel en procesos de biomineralización parece ser importante, ya que se ha podido detectar en procesos de precipitación de calcita (Zepeda-Mendoza y col., 2016). A nivel de género, se ha descrito la capacidad en ciertos miembros de precipitar carbonatos, como *Sporosarcina*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*, *Paenibacillus* y *Geobacillus* (Rusznayk y col., 2012; García y col., 2016), recientemente identificados en espeleotemas de cuevas kársticas (Dhami y col., 2018). Pero es en presencia de materia orgánica donde su representación es destacable (Ikner y col. 2007; Urzì y col. 2010; Northup y col. 2003). Además, es un grupo con un metabolismo secundario muy productivo, que ha permitido la obtención de compuestos interesantes desde el punto de vista biotecnológico (Youssri y Ibtihaj, 2018; Sarwar y col., 2018).

El filo *Acidobacteria* es muy común y abundante en cuevas y tubos de lava. Jones y colaboradores (2009) determinaron que su abundancia venía estrechamente correlacionada con el pH, factor determinante en un hábitat idóneo para este grupo. Observaron que la abundancia de miembros de este

filo aumentaba por debajo de un pH 5,5. Debido a su relativa importancia en la comunidad microbiana, se piensa que puede tener un papel relevante en los ciclos del carbono y nitrógeno (De Mandal y col., 2017). En cuevas con valor cultural, como Altamira (Schabereiter-Gurtner y col. 2002b) y La Garma (Schabereiter-Gurtner y col. 2004), así como en catacumbas Romanas (Zimmermann y col. 2006), aparecen con una elevada representatividad, lo cual podría poner de relieve la importancia de este grupo en los procesos de biodeterioro.

La coloración y pigmentación por parte de las distintas comunidades bacterianas que colonizan cuevas kársticas y tubos de lava ha sido motivo de estudio en los últimos años. De este modo, diversos autores trataron de encontrar patrones que relacionaran a comunidades específicas de bacterias con la pigmentación observadas en las colonias y biofilms que cubrían las paredes y techos de cuevas de origen kárstico (Portillo y col., 2008; Portillo y Gonzalez, 2009; Porca y col., 2012). Estos estudios sugirieron que los tapetes microbianos de coloración amarilla compartían un núcleo principal, compuesto por miembros de la familia de las *Pseudonocardiaceae*, del orden *Chromatiales*, y del género *Nitrospira*. Sin embargo, estos patrones no pudieron ser corroborados en estudios posteriores efectuados sobre la microbiología en los tubos de lava de California y Hawái, en EE.UU., así como en las Islas Azores, en Portugal (Hathaway y col., 2014; Riquelme y col., 2015a; Lavoie y col., 2017). En dichos estudios se observó la importancia de *Pseudonocardiaceae* y de otros miembros de actinobacterias en la pigmentación, al igual que se observó la presencia de algunos miembros pertenecientes a *Nitrospira* y *Chromatiales*, pero a diferencia de lo sugerido por Porca y colaboradores (2012), estos grupos no estuvieron asociados a la coloración observada en los tubos de lava. Por lo tanto, no se ha podido determinar un patrón claro de bacterias de determinados grupos taxonómicos como los causantes de la pigmentación amarilla en las colonizaciones observadas en los distintos ambientes subterráneos. No obstante, Lavoie y colaboradores (2017) sitúan a las actinobacterias con un papel fundamental en el desarrollo de pigmentaciones de diversa coloración, debido a la capacidad que tienen, por ejemplo, miembros de los géneros *Mycobacterium* y *Streptomyces* de producir diversos pigmentos como carotenoides o melaninas (Britton, 1998; Guo y col., 2014), o pigmentos asociados a la propia difusión de compuestos antimicrobianos, especialmente

por parte de *Streptomyces*, produciendo una coloración azul o roja en el medio (Hobbs y col., 1990).

Los hongos y levaduras son otros microorganismos con gran presencia e importancia en cuevas, colonizando rocas ígneas y sedimentarias como areniscas, granitos, calizas, mármoles y yesos, incluyendo minerales silicatados y aluminosilicatos, encontrándose este tipo de microorganismos incluso en condiciones extremas como desiertos cálidos y fríos (Staley y col., 1982; Ehrlich, 1998). La versatilidad metabólica de los diferentes miembros que se clasifican en este reino ha permitido colonizar los ambientes subterráneos utilizando la entrada de materia orgánica desde el exterior, los excrementos de troglobios, troglófilos y/o troglóxenos, o bien mediante cadáveres de otros organismos, especialmente artrópodos (Jurado y col., 2008). También se ha descrito la importancia de hongos zoopatógenos y entomófilos en cuevas y otros ambientes subterráneos, lo que ha permitido su mayor y mejor dispersión (Jurado y col., 2008; Bastian y col., 2009; Bizjak y col. 2018). No obstante, la importancia de los hongos como agentes activos en los ciclos biogeoquímicos ha sido tradicionalmente menos valorada en lo que concierne a procesos geomicrobianos (Gadd, 2008a). La incidencia de estos microorganismos en los procesos geológicos ocurre de forma biomecánica, mediante la penetración de las hifas fúngicas en el sustrato, y por mediación de la actividad bioquímica de los metabolitos secundarios. Los hongos se asocian, con frecuencia, con otros microorganismos, como algas, cianobacterias y bacterias, organismos quimioautótrofos que permiten ese aporte nutricional para la viabilidad de los hongos. Como consecuencia de esta relación, los últimos pueden producir metabolitos secundarios que llevan a cabo el ataque y solubilización de los minerales presentes en las rocas (Albertano y Urzì, 1999). La precipitación y formación de minerales orgánicos e inorgánicos, como oxalatos y fosfatos, y a través de la deposición de material cristalino, sobre y dentro de las paredes celulares, son el resultado de las actividades de degradación, excreción de metabolitos y/o fenómenos de sorción (Fomina y col., 2010; Ogórek y col., 2016). Slukin y colaboradores (2016) sugirieron que los hongos, entre otros organismos, podían ser precursores de biominerales tales como la gibsita, goetita o haloisita. Los hongos pueden producir ácidos, pigmentos y otros compuestos con propiedades quelantes (Sterflinger, 2000; Barton y Northup, 2007).

Algunos géneros más comunes en cuevas, como *Penicillium*, *Ochroconis* o *Aspergillus*, producen pigmentos que podrían ser la causa de la coloración de determinados tapetes microbianos (Sterflinger, 2000; Martin-Sanchez y col., 2012a). En la cueva de Lascaux (Francia), se descubrieron dos nuevas especies del género *Ochroconis*, *O. lascauxensis*, que junto con *O. anomala* producían melaninas creando una cobertura negra en las paredes de la cueva, amenazando la integridad de sus pinturas rupestres (Bastian y col., 2010; Martin-Sanchez y col., 2012b; De la Rosa y col., 2017).

Los hongos también son una interesante fuente de compuestos con un potencial interés desde el punto de vista biotecnológico. De hecho, el primer antibiótico descubierto y producido a gran escala fue la penicilina, descubierta por Alexander Fleming en 1928, de forma casual. La contaminación de un cultivo de *Staphylococcus* por un hongo del género *Penicillium* permitió a Fleming comprobar la capacidad bactericida de este hongo. Este descubrimiento ha motivado el desarrollo de estudios que han derivado en numerosos compuestos bioactivos desde entonces. Enzimas empleadas en la industria y biorremediación, antifúngicos, antibióticos y otras moléculas de utilidad en la medicina, como antitumorales o enfermedades neurodegenerativas, son algunos de los resultados de la caracterización de metabolitos de numerosos miembros del reino de los hongos (Yamanaka, 1995; Soponsathien, 1998; Strobel y col., 2002; Thirunavukkarasu y col., 2012).

1.3 WHOLE GENOME SEQUENCING Y METAGENÓMICA FILOGENÉTICA: LA SECUENCIACIÓN MASIVA COMO IMPULSO A LA MICROBIOLOGÍA DE AMBIENTES SUBTERRÁNEOS

Las diferentes metodologías implementadas para el estudio de la biodiversidad microbiana comprenden las técnicas de microbiología tradicional, como cultivos en medio sólido y líquido, así como las de biología molecular o técnicas independientes de cultivo. Las técnicas dependientes de cultivo se ven limitadas a la hora de identificar las comunidades microbianas del área de estudio debido a la dificultad de cultivar los microorganismos

(Ward y col., 1995), bien sea porque pueden permanecer en estado de latencia durante gran parte de su ciclo de vida (Gonzalez y Saiz-Jimenez, 2005), o debido a exigencias nutricionales y ambientales, propias de las cuevas y otros entornos subterráneos (Barton y Jurado, 2007). De este modo, los análisis basados en técnicas de biología molecular han servido para superar las trabas de la microbiología tradicional (Head y col., 1998; Muyzer y col., 1998) e impulsar los estudios de microbiología ambiental.

Esta evolución tomó forma especialmente a finales del siglo XX, donde la combinación de técnicas de cultivo e independientes de cultivo ofreció una perspectiva más completa de las comunidades microbianas. Entre estas últimas se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se fundamenta en la amplificación de marcadores filogenéticos, como el gen ARNr 16S, para procariotas, y el gen ARNr 18S y la región contenida entre los espaciadores internos transcritos (ITS), para el caso de eucariotas. También se usa en la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y en la técnica de clonación de marcadores ADN/ARN (Pace, 1997). Estas técnicas ofrecen una buena aproximación a la diversidad existente en el nicho ecológico a analizar, pero también se encuentran limitadas por diferentes sesgos (Al-Awadhi, y col., 2013; Neilson y col., 2013). Este hecho hace que se pueda disponer de una visión general de las comunidades microbianas, pero no de una visión completa de la diversidad en una muestra ambiental (Hershey y Barton, 2018).

Por ello, la aparición de técnicas de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación (NGS) ha supuesto una revolución, potenciando especialmente el desarrollo de las llamadas ciencias ómicas aplicadas a estudios ambientales (Joly y Faure, 2015). En este punto, los análisis de la genómica y metagenómica filogenética y funcional han dado un importante impulso al conocimiento del microbioma de los diferentes ambientes, también de cuevas, tubos de lava y otros entornos subterráneos (Zepeda Mendoza y col., 2016; Maciejewska y col., 2017; Kumaresan y col., 2018).

1.3.1 EL ORIGEN: TÉCNICAS DEPENDIENTES DE CULTIVOS

En los orígenes de la microbiología ambiental, todos los estudios llevados a cabo para obtener información sobre los microorganismos y sus

procesos bioquímicos se basaban en la implementación de técnicas de cultivos. Una de las técnicas más utilizadas en microbiología ambiental son los cultivos de enriquecimiento. En estos cultivos la muestra natural se inocula en medios específicos, normalmente líquidos, que favorecen determinados factores diferenciales ambientales a los que están sometidas las poblaciones microbianas. Este proceso se desarrolla bajo unas condiciones concretas, y se utiliza para seleccionar grupos de microorganismos favoreciendo su crecimiento (Shi y col., 1999).

Estas técnicas han sido igualmente empleadas para el estudio de la microbiología en cuevas con el objetivo de caracterizar la diversidad microbiana (Hose y col., 2000; Ikner y col., 2007), así como identificar nuevas especies adaptadas a ambientes subterráneos, tanto procariotas como eucariotas. Son los ejemplos de la cepa bacteriana *Thiobacillus thioparus* LV43 (Vlasceanu y col., 1997), quimiolitotrofo sulfuro-oxidante aislada en la cueva Movile, al sur de Rumanía, así como *Ochroconis lascauxensis*, aislado en la cueva de Lascaux, Francia (Martin-Sanchez y col., 2012b). De forma paralela, la microbiología dependiente de cultivos ha permitido conocer las interacciones microbio-mineral como la precipitación de calcita (Baskar y col., 2006; Rusznyák y col., 2012) o la biogeoquímica de los microorganismos ferro y manganeso oxidantes (Boston y col., 2001; Northu y col., 2003), así como para obtener un cribado de los microorganismos susceptibles de producir compuestos bioactivos (Yücel y Mustafa, 2010; Kim y col., 2010).

Originalmente, la metodología que se seguía para la identificación de los microorganismos cultivables se centraba en el estudio morfológico de las células, las tinciones Gram o la presencia de estructuras como las esporas (Bisen y col., 2012). Pero todo ello cambió con el desarrollo de técnicas de biología molecular.

Desde que Watson y Crick propusieran el modelo de doble hélice del ADN, la comunidad científica se lanzó a desarrollar metodologías que permitieran ordenar las bases nitrogenadas que conformaban esta molécula de forma secuencial. Los primeros métodos de secuenciación del ADN surgieron en los años 70, con los métodos de Maxam-Gilbert (1977) y Sanger (1975), siendo este último el más ampliamente utilizado debido a su menor toxicidad con respecto al primero. Posteriormente, el desarrollo de las

técnicas de secuenciación de nueva generación, también denominadas secuenciación masiva o NGS, de su acrónimo en inglés, han supuesto una revolución en el campo de la secuenciación de los ácidos nucleicos (Van Dijk y col., 2014).

El desarrollo de la PCR junto a mejoras en la secuenciación Sanger, supuso un notable impulso a los estudios del ADN (Saiki, 1988; Hunkapiller y col., 1991). Igualmente, la PCR ha sido un pilar fundamental en la aparición de las primeras tecnologías de secuenciación masiva (Heather y Chain, 2016).

La amplificación por PCR del ADN extraído de las células ha venido utilizándose en los estudios de microbiología ambiental para identificar las comunidades de microorganismos, amplificando y, posteriormente, secuenciando los genes ARNr 16S, 18S y la región ITS, también llamados *marcadores*. El ARNr es parte del ribosoma, el cual es fundamental en el proceso de traducción donde el ARN mensajero (ARNm) es “leído” para crear secuencias peptídicas, precursores de las proteínas. Las bacterias y arqueas disponen de tres secuencias en el ARNr, el ARNr 5S y el ARNr 23S, que forman parte de la subunidad mayor o LSU, mientras que el ARNr 16S se localiza en la subunidad menor o SSU. Por su longitud (1500 pares de bases) y por contener regiones altamente conservadas y muy variables, el análisis del gen ARNr 16S se ha distinguido por ser la técnica más utilizada en los estudios de diversidad. Las regiones conservadas permiten diseñar oligonucleótidos específicos que se pueden utilizar para amplificar genes ARNr 16S de bacterias y arqueas. Las regiones variables permiten diferenciar los distintos microorganismos, identificarlos y realizar estudios filogenéticos para conocer el origen evolutivo de las distintas especies de procariotas. Siguiendo la misma filosofía, del mismo modo que se ha venido utilizando esta técnica de forma masiva en microbiología ambiental para el estudio de procariotas, se han analizado las secuencias 18S y los Espaciadores Internos Transcritos o ITS en el caso de microorganismos eucariotas (Engel, 2015).

La aparición de estas técnicas ha impactado notablemente en la taxonomía, generando numerosas nuevas especies que mediante los estudios fisiológicos tradicionales no hubiese sido posible descubrir (Reller y col., 2007). No obstante, en algunos géneros como *Bacillus* y *Streptomyces*, se produjo una “sobre especiación”, ya que muchos miembros en estos géneros comparten fenotipos muy similares y secuencias del gen ribosómico ARNr

16S (Guo y col., 2008). Para resolver este problema, Maiden y colaboradores (1998) idearon la Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) como método para clasificar patógenos debido a la ambigüedad que representaba su identificación. Esta técnica también ha sido utilizada en análisis filogenéticos de géneros altamente diversos, como *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Haemophilus* (Hilario y col., 2004; Devulder y col., 2005; Nørskov-Lauritsen y col., 2005). La MLST se definió como una técnica de tipado para la caracterización de cepas que mostraban variabilidad alélica en múltiples genes constitutivos (Maiden, 2006; Glaeser y Kämpfer, 2015). Aunque al principio los estudios basados en la MLST no estaban dirigidos a calcular relaciones filogenéticas, la información en las secuencias de los perfiles alélicos puede usarse para cálculos filogenéticos y, por tanto, para la clasificación e identificación de especies procariotas, ofreciendo una visión más explícita de las relaciones filogenéticas entre sus grupos (Maiden, 2006; Glaeser y Kämpfer, 2015). De este modo nace el Análisis Multilocus de Secuencias (MLSA), centrado en el estudio de los genes *atpD* (ATP sintasa F1, subunidad β), *gyrB* (ADN girasa, subunidad B), *recA* (recombinasa A), *rpoB* (ARN polimerasa, subunidad β) y *trpB* (triptofano sintasa, subunidad β), junto con la secuencia del ARN ribosómico 16S. Estos genes, altamente conservados, deben de contener suficiente variabilidad nucleotídica para establecer con precisión la relación entre cepas estrechamente relacionadas (Rong y Huang, 2014). Estos análisis se han realizado en estudios de microbiología de cuevas con la finalidad de identificar nuevas especies, dirigidos tanto a aportar nueva información al conocimiento científico global sobre las comunidades de microorganismos en cuevas, como a la producción de compuestos bioactivos (Maciejewska y col., 2016; Dominguez-Moñino y col., 2017).

Lamentablemente los análisis de diversidad microbiana basados en cultivo están sometidos a sesgos la dificultad de extrapolar al laboratorio las condiciones del nicho ecológico de las comunidades, por lo que se podría dar el caso de aislar microorganismos con un bajo peso específico dentro de la comunidad microbiana estudiada. De hecho, se estima que el 99% de los microorganismos dispersos en el medio ambiente no son conocidos por cultivos (Engel, 2015).

Afortunadamente, el desarrollo de técnicas independientes de cultivo agrupadas en el campo de la biología molecular, han permitido no solo

eliminar este sesgo, sino realizar análisis más profundos, consiguiendo datos de diversidad, abundancia y funcionalidad muy fiables, a la vez que se reducen los tiempos de ejecución e interpretación de los resultados.

1.3.2 PRIMERA REVOLUCIÓN METODOLÓGICA: TÉCNICAS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

Las técnicas independientes de cultivo se basan en el estudio de marcadores mediante el uso de la PCR y la secuenciación con el método Sanger, en esta ocasión el ADN no se extrae de células de microorganismos cultivados, sino de aquellos que colonizan una muestra ambiental (Su y col., 2011).

La primera técnica independiente de cultivo fue la desarrollada por Pace y colaboradores (1985) basada en la clonación del ADN ambiental en células competentes. La clonación ha sido muy utilizada en estudios de microbiología de cuevas desde principios del presente siglo hasta la irrupción de las tecnologías de secuenciación NGS (Vlasceanu y col., 2000; Gonzalez y col., 2006; Cuezva y col., 2012; Porca y col., 2012; Riquelme y col., 2015a). El fundamento de esta técnica reside en analizar la totalidad de la comunidad microbiana a partir de una muestra natural de interés. Para ello se extrae el ADN/ARN de la muestra y se amplifican los marcadores por PCR. Estas copias de los marcadores se encuentran en proporción a la abundancia y diversidad real de los microorganismos presentes en la muestra estudiada. Esos marcadores son introducidos a través de vectores de clonación o plásmidos por transformación en células de *Escherichia coli*, microorganismo modelo frecuentemente utilizado. Cada *E.coli*, ahora denominado clon, contiene un único marcador por célula que pasa por otro paso de amplificación utilizando oligos específicos para seleccionar el marcador de interés introducido y se secuencia el producto de dicha amplificación, consiguiendo como resultado la secuencia del marcador de cada microorganismo presente en la muestra natural (Green y col., 2012). Al conjunto de clones analizados se denomina librería o genoteca de clones (Leigh y col., 2010).

El constante análisis de las secuencias de los marcadores, especialmente del gen ARNr 16S, ha favorecido la aparición de bases de datos

parar almacenar las secuencias, como se indicaba anteriormente. Entre las más usadas a día de hoy, para cualquier tipo de secuenciación de marcadores, se encuentran: SILVA, RDP, Greengenes, NCBI y EzBioCloud (DeSantis y col., 2006; Quast y col., 2013; Cole y col., 2014; O'Leary y col., 2016; Yoon y col., 2017). Las secuencias a analizar son enfrentadas a las bases de datos para identificar microorganismos. Sin embargo, es frecuente en estos estudios no alcanzar la identificación a nivel de especie de la mayoría de los microorganismos, clasificándolos como grupos “no cultivables”.

Las limitaciones de esta técnica provienen de varios factores, tanto técnicos como biológicos. Por ejemplo, a nivel de PCR, el uso de oligos que no son lo suficientemente universales puede omitir la presencia de una comunidad de microorganismos en la muestra, o también que la actividad de la polimerasa sea lenta o se vea obstruida en determinadas secuencias (Polz y Cavanaugh, 1998; Kanagawa, 2003). Desde el punto de vista biológico, en la fase de transformación ciertas secuencias pueden inhibir el crecimiento de *E. coli*, o en la fase de extracción de los ácidos nucleicos de las muestras naturales, siendo más fácil su extracción en unos microorganismos que en otros (Engel, 2015). Después existe un sesgo inherente a cualquier estudio del gen ARNr 16S, que es la duplicidad del operón *rrn* en determinadas bacterias, lo que distorsiona los resultados de abundancia en estos análisis (Acinas y col., 2004). Por otra parte, está el factor cuantitativo de esta técnica, debido al número de clones obtenidos para la construcción de librerías, ya que la recogida individual de la bacteria modelo con cada inserto del marcador de la muestra natural implica que, normalmente, se dispongan de pocos centenares de secuencias finales para realizar el estudio de una muestra. Este hecho podría dar una visión limitada de la distribución y de la caracterización de la comunidad microbiana de la muestra estudiada (Crosby y Criddle, 2003).

Otras técnicas ampliamente utilizadas para el estudio de la microbiología ambiental han sido la *Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante* o DGGE (Fischer y Lerman, 1983) y la *Hibridación Fluorescente In Situ* o FISH (Rudkin y Stollar, 1977; Trask, 2002; La Cono y Urzì, 2003; Speicher y Carter, 2005). En el caso de la DGGE, en lugar de amplificar el marcador completo, como se hace en la clonación, se amplifican fragmentos cortos de estos marcadores. El fundamento de esta técnica reside en separar e identificar las distintas comunidades microbianas según su

distribución nucleotídica, la cual será más o menos resistente a un gradiente de desnaturalización. Así, secuencias con un contenido G+C más elevado, conseguirán resistir gradientes más elevados que aquellas secuencias con un contenido G+C más bajo, debido a que la unión entre guaninas y citosinas consta de tres puentes de hidrógeno, mientras las uniones de adenina y timina consta de dos. Las limitaciones de esta técnica provienen, principalmente, de los niveles taxonómicos que alcanza a identificar debido al corto fragmento del marcador que se analiza (200 pb). Esta técnica ha sido utilizada en numerosos estudios microbiológicos de ambientes subterráneos, buscando dar respuesta a procesos de biodeterioro y de biomineralización (Portillo y col., 2008; Stomeo y col., 2008; Diaz-Herraiz y col., 2013; Espino del Castillo y col., 2018).

En el caso de la técnica FISH, el proceso básico se asienta en la hibridación de una sonda en el material genético de los microorganismos. Esta sonda consta de una cadena de nucleótidos con una secuencia que interacciona con el ADN/ARN de un grupo taxonómico buscado. Dicha sonda contiene un fluoróforo, el cual emite una fluorescencia selectiva al hibridar con la comunidad de microorganismos buscada dentro de la muestra natural estudiada, haciendo uso de microscopía de epifluorescencia o microscopía de escaneo láser confocal (O'Connor, 2008). Las ventajas de esta técnica residen en la fijación de las células de la muestra, preservando sus estructuras, y en la ausencia de sesgos por no hacer uso de extracciones de ADN, PCR o transformación de *E.coli*. FISH no ha sido utilizado de manera muy extensa en estudios de microbiología en cuevas, destacando los realizados por Jones y colaboradores (2006) y Macalady y colaboradores (2010).

1.3.3 SEGUNDA REVOLUCIÓN METODOLÓGICA: TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS ÓMICAS

Las tecnologías de secuenciación masiva de alto rendimiento o *High-Throughput Next Generation Sequencing* (HT-NGS) nacieron tras secuenciarse, mediante Sanger, el genoma humano en los Estados Unidos (IHGSC, 2004). Tras haber invertido 14 años y 3000 millones de dólares destinados a recursos humanos y técnicos para su consecución, en 2004 se ideó un programa por parte del *National Human Genome Research Institute*

(NGHRI) cuyo objetivo era el desarrollo y comercialización de tecnologías de secuenciación que lograran secuenciar un genoma humano por 1000 dólares, en 10 años (Schloss, 2008). En concreto, los puntos sobre los que se deberían de asentar estas técnicas eran los siguientes:

- Generar secuencias masivamente. De forma paralela se obtendrían miles y millones de secuencias en cada ejecución del secuenciador.
- Reducir los tiempos de secuenciación.
- Reducir costes en la secuenciación.

Como resultado de dicho programa, apareció la primera tecnología de secuenciación masiva de alto rendimiento para producción comercial. Se trataba del sistema de secuenciación por pirosecuenciación, lanzado por 454 Life Sciences, en el año 2005 (Margulies col., 2005). La secuenciación del ADN se realizaba de forma paralela obteniendo hasta 200 mil lecturas y secuencias de 100 y 150 pares de bases. En 2007 la empresa fue adquirida por Roche Diagnostics y la tecnología de secuenciación fue avanzando, llegando a aumentar el tamaño de las lecturas, alcanzando entre 700 y 1000 pares de bases. La pirosecuenciación se fundamenta en la generación de una señal quimioluminiscente por cada nucleótido secuenciado a tiempo real. Esta señal se origina por una pareja de enzimas que se añaden a la polimerasa y a los desoxirribonucleótidos (dNTPs). La enzima sulfúrilasa y luciferasa convierten el pirofosfato liberado por la polimerasa al ligar un dNTP con la cadena molde en ATP y éste junto con luciferina emiten la señal de luz. La señal es más intensa si la secuencia contiene sucesivas bases del mismo nucleótido, es decir, si el fragmento de ADN secuenciado contiene seis timinas consecutivas, la intensidad de la señal será seis veces mayor a la señal emitida cuando el fragmento contiene una única timina (Fig.2).

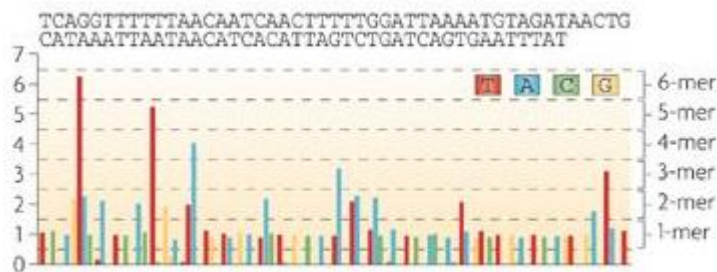


Figura 2. Diagrama de flujo generado por la reacción quimioluminiscente de secuenciación.
Fuente: Metzker, 2010.

Esta secuenciación se basa en el uso de la amplificación por PCR, al igual que la siguiente tecnología que apareció en el mercado en 2006 por parte de Solexa, y posteriormente adquirida por Illumina en 2007 (Bentley y col., 2008; Voelkerding y col., 2009). Los procedimientos de amplificación en esta tecnología difieren de la pirosecuenciación utilizada por la plataforma 454 de Roche, así como en el proceso de secuenciación donde se utilizan nucleótidos marcados fluorescentemente de manera que en cada incorporación de nucleótidos se emite una luz que es captada en forma de imagen por dos láseres que determinan la identidad del nucleótido incorporado. Cada nucleótido tiene asignado un color diferente. La incorporación de nucleótido y toma de imagen se repite de forma cíclica en un proceso denominado *terminación reversible cíclica (CRT) de cuatro colores*, de manera que el número de ciclos que se sucedan durante la secuenciación paralela, marcará la longitud de las lecturas generadas durante el procesamiento del material genético (Metzker, 2010). Los secuenciadores de Illumina sintetizan lecturas de longitudes cortas, entre 46 y 300 pares de bases, y producen desde 12 millones de lecturas, en los secuenciadores *MiSeq*, orientados a experimentos de genómica para la secuenciación de pequeños genomas como el de bacterias y metagenómica, hasta 5.000 millones de lecturas en secuenciadores de muy alto rendimiento, como el *HiSeq 4000*, apropiado para experimentos más complejos.

Existen ventajas y desventajas en cada una de las tecnologías descritas. Illumina produce una generosa cantidad de lecturas con respecto a las obtenidas a través de la pirosecuenciación, lo cual permite disponer de más información. Por el contrario, la mayor longitud de las lecturas obtenidas por 454 (700-1000 frente a 100-500 pares de bases) condiciona el

uso de Illumina en determinados estudios de ensamblaje y ordenación de genomas de nuevas especies o análisis *de novo*, en los que no se tienen secuencias de referencia previa. Aun así, los datos obtenidos tras secuenciar con Illumina ofrecen información funcional de nuevos genomas sin que se lleve a cabo la finalización del genoma, lo cual es algo técnico y económicamente más costoso, y que comprende el reordenamiento y la correcta orientación de las secuencias, así como la amplificación y secuenciación de ciertos segmentos del genoma que los secuenciadores Illumina no son capaces de conseguir (La Scola y col., 2008; Greub y col., 2009; Da Silva y col. 2018). De esta manera, se obtiene lo que se denomina un *draft genome* o “borrador de genoma”. Una estrategia muy extendida es la combinación de ambas técnicas de secuenciación para lograr un análisis del genoma completo más preciso (Rodrigue y col., 2009). Además, el factor calidad de las lecturas favorece a la secuenciación por Illumina, ya que la pirosecuenciación tiende a generar numerosas lecturas con regiones homopolímeras, es decir, secuencias de bases idénticas consecutivas, que reducen la precisión de las lecturas y, por tanto, la calidad del análisis. Ambas tecnologías de secuenciación masiva, 454 de Roche e Illumina, pertenecen a la segunda generación de secuenciación del ADN (Heather y Chain, 2016) debido a la aplicación de procesos de amplificación del material genético por PCR. Existen otras tecnologías de secuenciación enmarcadas en este grupo, como SOLID, que surgió en el año 2006 en la compañía *Life Technologies*, pero no ha tenido el mismo éxito comercial de las dos anteriores, especialmente Illumina, que actualmente es la más utilizada (Glenn, 2011).

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva de alto rendimiento ha continuado evolucionando en los últimos años. De hecho, en años posteriores a la aparición de las tecnologías de HT-NGS surgieron nuevos secuenciadores cuyo fundamento no se basa en la amplificación por PCR del ADN. Esta característica define la tercera generación de secuenciación masiva (Heather y Chain, 2016), que también se caracteriza por el procesado continuo del ADN, sin ciclos, al contrario de las metodologías de segunda generación. Los secuenciadores más utilizados son PacBio de Pacific Biosciences y los MinION, GridION y PromethION, fabricados por Oxford Nanopore. Pacific Bioscience, que lanzó su primer secuenciador en 2010, puede llegar a reproducir lecturas muy largas, consiguiendo alcanzar las 60 mil bases, sin embargo, genera una cantidad de lecturas totales muy inferior con respecto a Illumina. Además, tiene una tasa

de error elevada, en torno al 14%. Aunque su metodología comenzó a tomar forma en los primeros años del plan del NGHRI (Branton y col., 2008), la tecnología de Nanopore se presentó en 2012 (Schaffer, 2012). Es una metodología nueva con un prometedor futuro, ya que es capaz de generar secuencias de longitud superior a cinco mil bases, de forma más rápida y en mayor número en relación a PacBio. Especialmente interesante es el dispositivo MinION, el cual tiene un tamaño similar al de un teléfono móvil y puede ser útil para realizar la secuenciación *in situ*, sin necesidad de transportar la muestra al laboratorio, dejando intacta la integridad de la muestra a estudiar (Ashton y col., 2015; Lu y col., 2016).

1.3.4 ÓMICAS Y ESTRATEGIAS DE ESTUDIO: SECUENCIACIÓN DE GENOMAS COMPLETOS Y ANÁLISIS DE AMPLICONES

La aparición de las tecnologías de HT-NGS ha supuesto un punto de inflexión en los estudios de microbiología ambiental, de forma que han sustituido o complementado los estudios que hasta entonces se llevaban a cabo. En el análisis de la diversidad microbiana, las HT-NGS han permitido generar extensas librerías con los marcadores usados en clonación, con las ventajas de disponer de una vasta cantidad de datos a analizar, a menor coste económico.

Existen numerosos estudios sobre diversidad microbiana de cuevas y tubos de lava centrados en pirosecuenciación de 454 de Roche y en illumina (De Mandal y col., 2015a; Riquelme y col., 2015b; Lavoie y col., 2017; Maciejewska y col., 2018).

Las plataformas NGS tienen las ventajas de evitar el sesgo que proviene de la transformación en la célula modelo. Sin embargo, el principal hándicap de la secuenciación con las plataformas Illumina es la longitud de las secuencias obtenidas, lo cual permite alcanzar una resolución taxonómica a nivel de género sin conseguir unos resultados fiables a niveles de especies o cepas (Engel, 2015). La limitada longitud de las lecturas generadas por la secuenciación de Illumina podría desestimar a esta tecnología por inapropiada para los estudios de los perfiles microbianos, sin embargo, esta idea se puede descartar si el análisis se centra en la identificación de aquellas regiones de mayor información taxonómica (Pawlowski y Lecroq, 2010). De

hecho, Caporaso y colaboradores (2010a) demostraron que se podían construir librerías de amplicones del marcador ARNr 16S a partir de lecturas cortas obtenidas por Illumina, consiguiendo una sólida reconstrucción de las comunidades microbianas. La aparición de la bioinformática como disciplina integrada al análisis de los datos derivados de la secuenciación NGS ha facilitado la interpretación de esta información (Caporaso, 2010b y 2012).

Si bien el gen ARNr 16S está altamente conservado en los microorganismos, este dispone de nueve regiones hipervariables que difieren en su longitud, posición y discriminación taxonómica (Van de Peer, 1996). Diferentes estudios han demostrado que las regiones V3/V4 son las que proporcionan una mejor identificación de taxones (Fadrosh y col., 2014; Yergeau y col., 2015; Thijs y col., 2017; Graspeuntner y col., 2018).

El sufijo *ómica* se refiere al estudio de aquellas disciplinas en Biología como la Genómica, Transcriptómica, Proteómica y Metabolómica, las más utilizadas, centradas en el estudio de la detección de genes, del ARN mensajero, las proteínas y de los metabolitos, respectivamente, adoptando una visión holística de estas moléculas en la célula, tejido u organismo (Horgan y Kenny, 2011), y que se han visto impulsadas por la aparición de las plataformas NGS.

En Genómica se estudia el ADN de un organismo en su conjunto, es decir, la totalidad de genes que dicho organismo posee. La aparición de las tecnologías de HT-NGS ha supuesto un impulso significativo en el conocimiento del funcionamiento del genoma completo, reduciendo la brecha entre genotipo y fenotipo (Vailati-Riboni y col., 2017). Conviene diferenciar entre Genética y Genómica. La primera se dedica al estudio de la herencia, es decir, la transferencia de características de un organismo a su descendencia a través del ADN (Griffiths y col., 2000). Con la Genómica se busca determinar el número de genes presentes en el organismo, la identificación de estos y su función para comprender de qué manera influyen en determinados rasgos de interés.

En los últimos años se han aplicado las ciencias *ómicas* para estudiar microorganismos aislados de cuevas, y así analizar su relevancia en distintos procesos biológicos. Por ejemplo, Kumaresan y colaboradores (2018), estudiaron la presencia de clústeres de genes implicados en la degradación del metano, y otros procesos relacionados con ciclos biogeoquímicos, en una

nueva bacteria aislada en la cueva *Movile*, en Rumania. Estudios genómicos de actinobacterias aisladas en moonmilk arrojaron luz sobre la controversia existente en la comunidad científica sobre qué procesos estaban detrás de la formación de este espeleotema (Maciejewska y col., 2017). A través de la minería de datos obtenidos en la secuenciación de los genomas completos de bacterias del género *Streptomyces*, se detectaron evidencias genéticas que implicaban a estos microorganismos en la formación de espeleotemas, gracias a la capacidad de promover la calcificación a través de rutas metabólicas involucradas en biomineralización. También se han estudiado microorganismos presentes en cuevas para obtener información sobre procesos de resistencia a antibióticos (Bhullar y col., 2012; Pawlowski y col., 2016). El estudio llevado a cabo por Pawlowski y colaboradores (2016) se basó en la información obtenida a través de la secuenciación del genoma completo de la bacteria *Paenibacillus* sp. LC231, aislada de la cueva de *Lechuguilla*, EE.UU., lo cual ha servido para identificar hasta 18 elementos de resistencia a antibióticos, incluidos tres nuevos mecanismos de resistencia.

Desafortunadamente, como ya se indicó anteriormente, la mayor parte de los microorganismos localizados en los distintos hábitats no pueden ser cultivados. Esto podría llevar a una deficiente interpretación de los procesos biológicos debido a un sesgo de información. Para paliar este inconveniente, surgieron las *meta-ómicas* (Segata y col., 2013). El prefijo *Meta* hace referencia al estudio *in situ* de cualquiera de las disciplinas dentro de las ciencias *ómicas*. En otras palabras, las *meta-ómicas* tienen como objetivo identificar un panel de microorganismos, genes, variantes, rutas o funciones metabólicas caracterizando una comunidad microbiana en una muestra no cultivable (Vieites y col., 2009; Segata y col., 2013). Las principales son la metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica y la metabolómica.

Estos estudios han dado respuestas a preguntas generadas al estudiar una muestra natural a través de las metodologías anteriormente referidas (Van Dijk y col., 2014). A través de la metagenómica se puede obtener información de la diversidad microbiana llegando a nivel de especies, rutas metabólicas y genes que codifican enzimas de interés (Tetu y col., 2013; Hamilton y col., 2015). Potencialmente se pueden llegar a obtener borradores de genomas de microorganismos no cultivables. De hecho, Stewart y colaboradores (2018) fueron capaces de ensamblar 913 genomas

de bacterias y arqueas, muchos de ellos nunca antes secuenciados, a partir del microbioma del rumen de una vaca y haciendo uso de 800 Gb de datos de secuencias metagenómicas obtenidas a través de la secuenciación de Illumina. Una práctica muy común ha sido la integración de dos o más análisis ómicos y/o *meta-ómicos*, como por ejemplo integrar estudios metagenómicos y metatranscriptómicos, con lo que no solo se estaría en disposición de describir el genoma de los microorganismos presentes en la muestra, sino de descubrir qué genes están expresándose en la muestra en el momento del aislamiento (Johansson y col., 2013). Esta estrategia ya ha sido llevada a cabo en estudios sobre comunidades microbianas en ambientes subterráneos (Chen y col., 2015; Kumaresan y col., 2018). No obstante, la posibilidad de implementar estos análisis se puede ver limitada por la cantidad de biomasa disponible en las muestras naturales.

Conviene distinguir el estudio de amplicones por métodos de HT-NGS del análisis metagenómico del ADN total para obtener la diversidad microbiana en la muestra. Ambos métodos han sido implementados con la llegada de las tecnologías NGS. Si bien pueden compartir sesgos derivados de la amplificación del ADN, los flujos de trabajo implementados para el tratamiento de los datos obtenidos son diferentes. Mientras que el estudio de amplicones por HT-NGS amplifica las regiones de los marcadores a través de cebadores específicos, obteniendo fragmentos del gen a analizar, el estudio metagenómico de una muestra supone amplificar con cebadores aleatorios todo el material genético de la muestra, lo que conlleva un cribado inicial de información para finalmente conseguir las secuencias completas de los genes de interés. Ambos procesos conllevan la utilización de herramientas bioinformáticas muy diferentes, así como el hándicap de necesitar una gran cantidad de recursos hardware para los análisis metagenómicos, no tan exigentes en el caso del estudio a través de HT-NGS. Además, la metagenómica puede ser una opción que no solo permita obtener un perfil taxonómico más preciso, puesto que consigue ensamblar las secuencias completas de los marcadores, sino también ofrece un perfil funcional de las comunidades microbianas presentes en la muestra (Tetu y col., 2013; Zhang y col., 2018). No obstante, los estudios microbiológicos de muestras naturales necesitan una caracterización inicial del perfil taxonómico, que ofrezca los indicios necesarios para realizar estudios más precisos. Es decir, la evolución de las tecnologías de NGS y el desarrollo de la bioinformática ha reducido notablemente los costes de secuenciación, pero a día de hoy los análisis

metagenómicos continúan siendo computacional y económicamente más costosos, por lo que la estrategia debe de consistir en un estudio del perfil taxonómico a través de las metodologías de secuenciación de marcadores por medio de herramientas de HT-NGS, para posteriormente seleccionar aquellas muestras naturales de mayor interés sobre las que realizar estudios más profundos de metagenómica que ofrezcan una visión más concreta sobre el perfil funcional de las comunidades microbianas.

En definitiva, una buena aproximación para el estudio de las comunidades microbianas, así como para analizar el potencial metabólico de estas, supone el uso de tecnologías de NGS para combinar los resultados de técnicas basadas en cultivos e independientes de cultivo. En el primer caso ofrecerán una visión concreta de la capacidad funcional de los genomas de especies nunca antes descubiertas, lo que abre la puerta a la disponibilidad de nuevos recursos naturales aplicables a la Biotecnología, y en segundo lugar se obtendrá un amplio conocimiento sobre la distribución y abundancia de microorganismos que colonizan los tubos de lava objeto de estudio.

1.4 OBJETIVOS

1. Caracterizar las comunidades microbianas que colonizan los tubos de lava de la isla de La Palma (Canarias) mediante la implementación de técnicas dependientes e independientes de cultivos.
2. Identificar diferencias entre comunidades metabólicamente activas y comunidades microbianas totales.
3. Comparar las distintas técnicas y metodologías de biología molecular implementadas para la caracterización de las comunidades microbianas no cultivables.
4. Aislar e identificar nuevas cepas bacterianas mediante metodologías tradicionales de cultivo y la secuenciación de los genomas completos utilizando tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación.

5. Identificar los mecanismos de resistencia a antibióticos y los grupos de genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios de las nuevas cepas descritas por mediación de análisis *in silico* de los genomas secuenciados.
6. Diseñar estudios *in situ* para determinar la capacidad para producir antimicrobiales por parte de las nuevas bacterias descritas y el total de cepas identificadas en el género *Streptomyces* aisladas en la presente tesis doctoral.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MUESTRAS ESTUDIADAS

En la presente tesis doctoral se acometen los estudios de los microorganismos presentes en los espeleotemas de origen biogénico, así como aquellos biofilms que cubren las paredes y techos de los tubos de lava de La Palma (Islas Canarias). En total, se han realizado dos campañas de muestreo en los años 2015 y 2016, donde se han analizado arqueas, hongos y, principalmente, bacterias de 4 cavidades que se localizan en los términos municipales de El Paso y Villa de Mazo (Fig. 2.1). La denominación del tubo de lava a estudiar, así como el nombre y caracterización de cada muestra se describen en la Tabla 2.1. Los “mucolitos” son pseudo-estalactitas formadas con material orgánico. Los “coraloides” son espeleotemas con base de calcita, aragonito o yeso con morfología que recuerda al coral. Los “depósitos” son formaciones de tapetes microbianos colonizando el sustrato de roca de lava. Las “formaciones mucosas” son sub-sustratos de aspecto gelatinoso que cubre la roca volcánica y sobre el cual se asientan las colonias de microorganismos.

Tabla 2.1. Tubos de lava estudiados y muestras estudiadas.

Tubo de Lava	Muestra	Características
Cueva Honda del Bejenado (El Paso)	EP01-6F	Coraloides amarillos de calcita.
Cueva del Llano de los Caños (Villa de Mazo)	MZ04-2B	Mucolitos color ámbar
	MZ04-3C	
	MZ03-2B	Depósitos marrones cubriendo la pared
	MZ03-3C	Mucolitos color crema
	MZ03-6F	Depósitos amarillos sobre lava primaria
Fuente de la Canaria (Villa de Mazo)	MZ03-7G	Formación mucosa con depósitos blancos
	MZ03-8H	Depósitos amarillos y marrones sobre pared
	MZ03-9I	Moonmilk
	MZ03-10J	Formación mucosa con depósitos blancos
Búcara II de Montes Luna (Villa de Mazo)	MZ26-11K	Depósitos rosas bajo formación de moonmilk
	MZ26-12L	Moonmilk

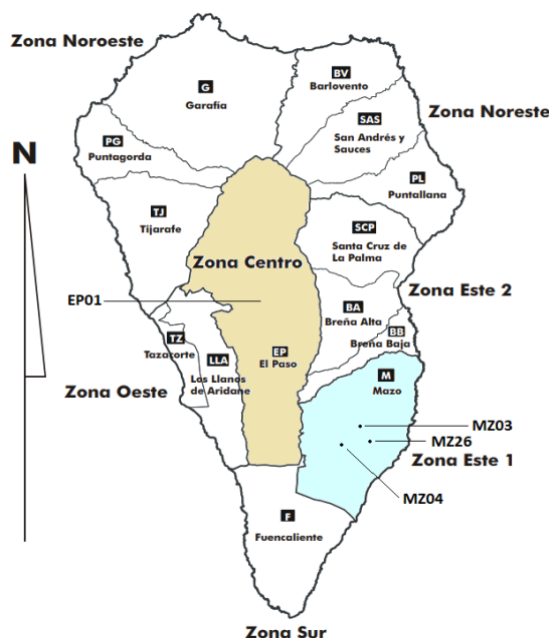


Figura 2.1. Mapa de La Palma, Islas Canarias. El estudio abarca 4 cuevas distribuidas en dos términos municipales distintos, El Paso (Cueva Honda del Bejenado) y la Villa de Mazo (Cueva del Llano de los Caños, Fuente de la Canaria y Búcara II de Montes Luna).

Los tubos de lava situados en la Villa de Mazo se encuentran influenciados por la actividad antrópica, debido a la presencia de terrenos de cultivos, en algunos casos, y por la interacción con núcleos urbanos, en otros. La “Cueva del Llano de los Caños” (Fig. 2.2 A) es un tubo de lava de difícil acceso y ciertamente inestable, por lo que la entrada de personas es inexistente o muy ocasional. De acceso igualmente complicado, el tubo de lava “Búcara II de Montes Luna” (sin mapa topográfico disponible) únicamente presenta afluencia de aves en las zonas cercanas al acceso de la cavidad. Por el contrario, el tubo de lava “Fuente de la Canaria” (Fig. 2.2 B) es una cueva de fácil acceso que ocasionalmente recibe visitas no organizadas. Por último, la “Cueva Honda del Bejenado” (Fig. 2.2 C) está localizada en el Parque Nacional del Taburiente, donde no hay actividad humana. La vegetación en la superficie se basa principalmente en coníferas y para su acceso es necesario solicitar el permiso a las autoridades que gestionan el Parque, por lo que la alteración por parte del ser humano es prácticamente nula.

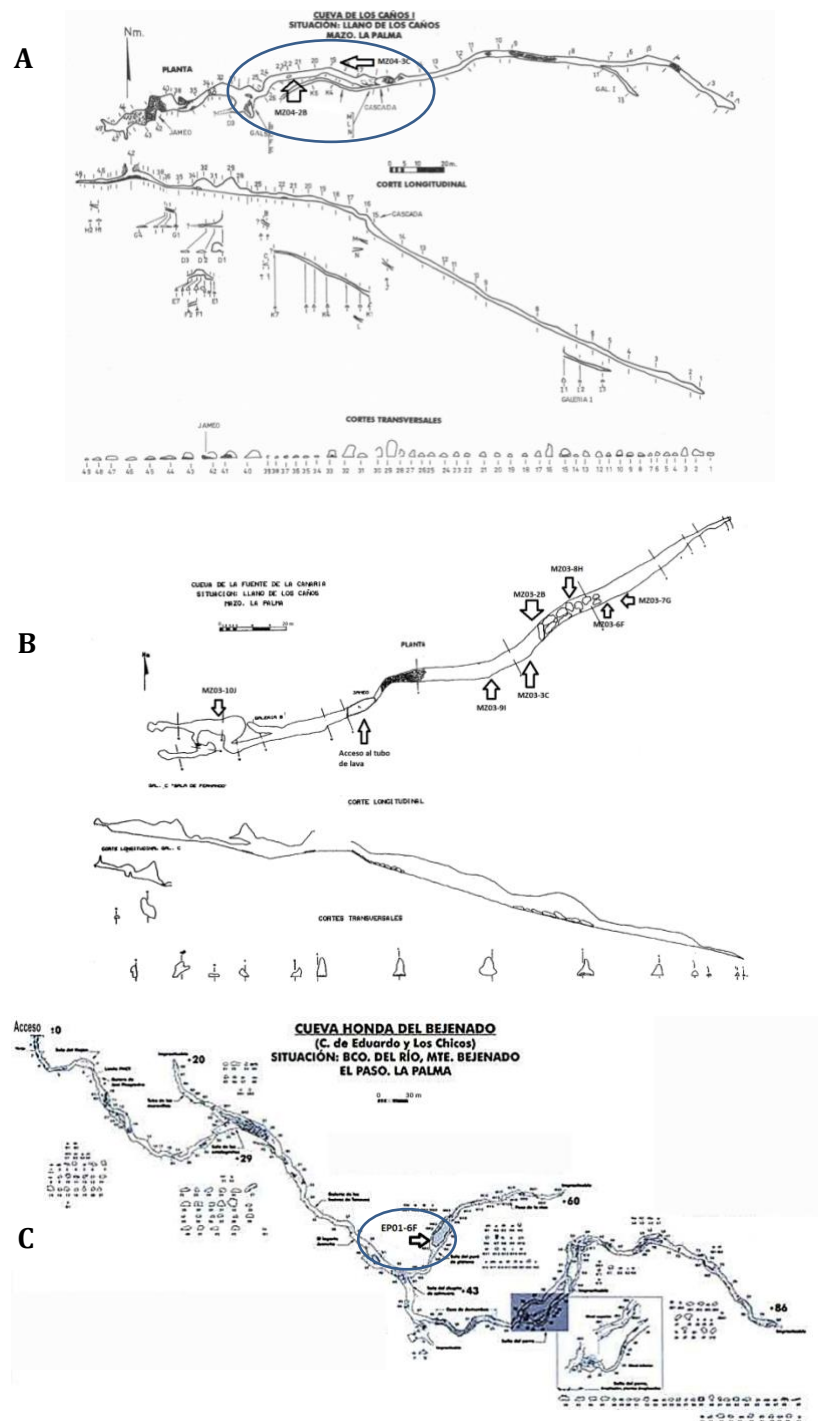


Figura 2.2. Mapas topográficos de los tubos de lava. (A) Cueva del Llano de los Caños: 368 metros de longitud. Coordenadas UTM: 28RBS2664; (B) Fuente de la Canaria: 238 metros de longitud. Coordenadas UTM: 28RBS267654 (VULCANIA. Revista de Espeleología del Archipiélago Canario, Vol.1); (C) Cueva Honda del Bejenado: 1363 metros de longitud. Coordenadas UTM: No disponible (Las cavidades volcánicas del Parque Nacional de la Caldera de Taburiente (2007) Ministerio de Medio Ambiente, España).

Todas las muestras recogidas para su estudio (Fig. 2.3) fueron obtenidas manteniendo las condiciones de esterilidad en el instrumental utilizado, arrastrando los depósitos por medio de bisturís y espátulas, así como herramientas mecánicas para extraer fragmentos de los diferentes espeleotemas a analizar, tanto de minerales secundarios como de lava primaria. Inmediatamente, las muestras se depositaron en tubos estériles de 1,5 mL y de 15 mL.

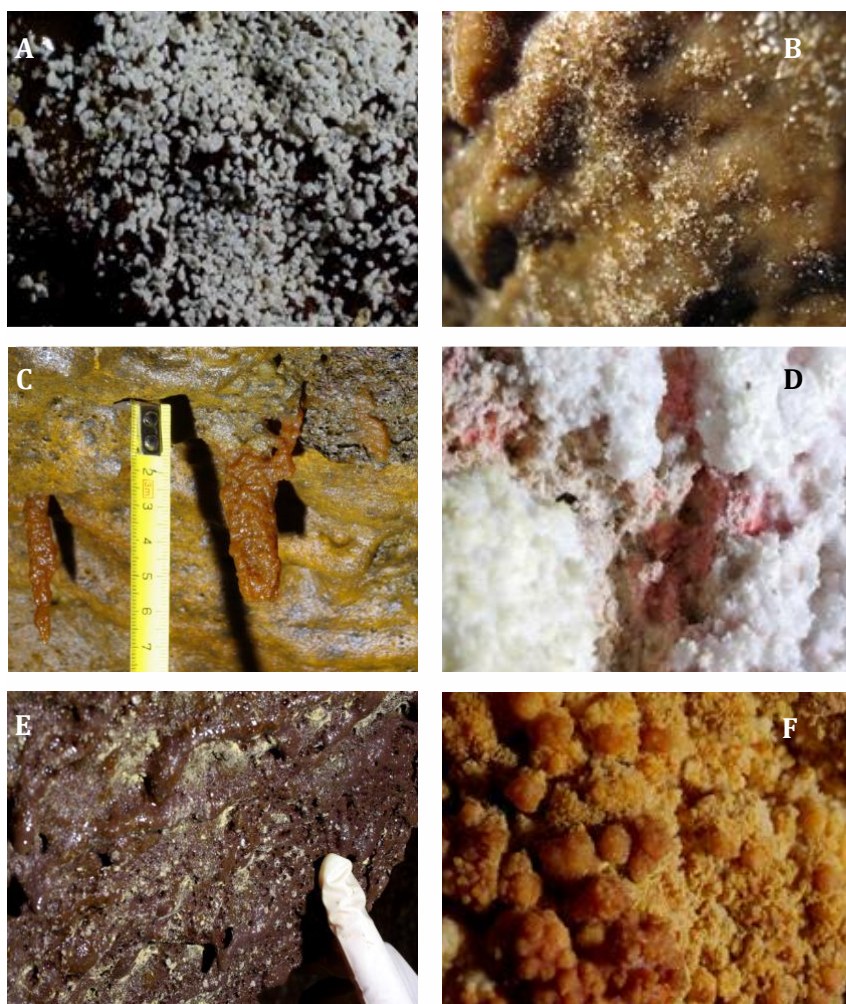


Figura 2.3. Muestras “Fuente de la Canaria”: MZ03-10J (A); MZ03-7G (B) y MZ03-6F (E). Muestra “Cueva del Llano de los Caños”: MZ04-2B (C). Muestra “Búcara II de Montes Luna”: MZ26-11K (D). Muestra “Cueva Honda del Bejenado”: EP01-6F (F)

Las muestras destinadas a cultivo y posterior aislamiento de microorganismos se conservaron en frío hasta su llegada al laboratorio, donde se procesaron. Las muestras destinadas a los análisis de los ácidos nucleicos fueron preservadas con DNA/RNA Shield (Zymo Research, EE.UU.) y mantenidas a 4 °C durante su transporte. Al llegar al laboratorio, estas muestras se conservaron a -80 °C en un congelador Revco Elite Plus (Thermo Scientific, EE.UU.).

Las muestras fueron analizadas de forma paralela, haciendo uso de técnicas dependientes e independientes de cultivo, con el fin de proceder a la descripción de las comunidades microbianas presentes en los tubos de lava.

2.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

2.2.1 AISLAMIENTOS CAMPAÑA 2015

Para el primer periodo de muestreo llevado a cabo en marzo de 2015, se cultivaron las muestras EP01-6F, MZ04-2B, MZ04-3C, MZ03-2B, MZ03-3C, MZ03-6F, MZ03-7G y MZ03-8H, con el objetivo de aislar e identificar la diversidad microbiana cultivable y nuevas especies. Cada muestra contenida en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL fue resuspendida en solución de NaCl al 0,85% (p/v) estéril y se inocularon en placas usando siete medios de cultivo distintos. Se utilizaron medios de cultivo para identificar bacterias capaces de oxidar manganeso, como es el medio Rouf modificado (Rouf y Stokes, 1964), o aquellos capaces de reducir azufre, como es el caso del medio halofílico HM (Oren, 2002). Adicionalmente, se utilizaron medios no selectivos nutritivos con exceso de sales: Agar nutritivo con magnesio al 3% ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) y glicerol al 2% (v/v); Triptona-soja con sodio al 3% y magnesio al 2% (NaCl; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$). Debido a la elevada presencia de actinobacterias en tubos de lava identificadas en trabajos anteriores similares (Northup y col., 2011; Hathaway y col., 2014), se utilizó el medio agar corynebacterium. Por último, se prepararon medios nutritivos generales: Agar nutritivo con almidón (NSA) y caldo de triptona-soja con agar (TSA).

Simultáneamente, cada muestra fue sometida a un proceso de congelación/descongelación a una temperatura de -80 °C para favorecer la activación celular y el crecimiento de bacterias raras (Bredholdt y col., 2007; Ulanova y Goo, 2015).

Para esta campaña de muestreo, también se llevaron a cabo estudios de aislamiento y caracterización de hongos y levaduras presentes en los tubos de lava. El medio de cultivo empleado para favorecer el desarrollo de estos microorganismos fue diclorán-rosa de bengala-cloranfenicol-agar (DRBCA, Merck, Darmstad, Alemania), con el objetivo de inhibir el crecimiento bacteriano (cloranfenicol), limitar el diámetro de las colonias y reducir el crecimiento aéreo (diclorán y rosa de bengala), lo cual permite el aislamiento de las colonias fúngicas (Beech y Carr, 1955).

Una vez realizada la siembra de las distintas muestras, las placas Petri fueron incubadas a 30 °C durante 2-3 meses en el caso de bacterias y 25 °C durante 3-4 semanas en el de hongos.

Conforme se fue apreciando la aparición de colonias de las muestras naturales, se llevó a cabo el aislamiento de colonias siguiendo un criterio basado en la morfología, color y/o textura de estas, sembrándolas en medio de cultivo fresco sobre el que originalmente se inocularon las muestras, repitiendo el proceso de aislamiento tantas veces como fuera necesario hasta obtener una única cepa microbiana por placa (Fig. 2.4). Todas las cepas fueron cultivadas en última instancia en un medio único, agar nutritivo con magnesio y glicerol (NA-Mg-G), para homogenizar las condiciones de crecimiento de las distintas cepas, evitando la duplicación de aislados con distinto fenotipo expresado en medios alternativos. Cada cepa bacteriana completamente aislada fue conservada individualmente en un criovial Microbank™ (Prolab-Diagnostics, Canadá) y almacenada en congelador a -80 °C.

En el caso de las cepas de hongos y levaduras, su conservación se llevó a cabo a través de dos metodologías: a) recolección de un asa de siembra en tubo de 1,5 mL de microcentrifuga al que se le añadió 1 mL de glicerol al 20% (v/v). Almacenamiento en congelador a -80 °C; b) siembra en tubo de centrifuga de 15 mL en medio agar con extracto de malta (MEA). Incubación a 25 °C hasta observar desarrollo de la cepa y posteriormente conservar a 4

°C. Este procedimiento debe repetirse frecuentemente para garantizar la viabilidad del microorganismo.

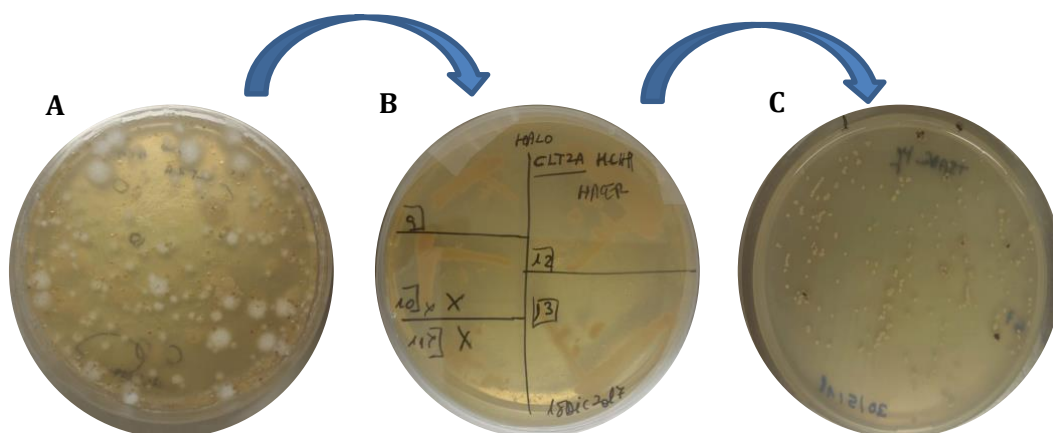


Figura 2.3. (A): Placa con siembra a partir de muestra natural; (B): Placa con el aislamiento de colonias; (C): Placa con el cultivo de una cepa aislada.

2.2.2 AISLAMIENTOS CAMPAÑA 2016

Para el segundo periodo de muestreo, realizado en marzo de 2016, se volvieron a recolectar y a cultivar muestras de la “Cueva Honda del Bejenado” (EP01-6F) y de la “Fuente de la Canaria”. En el caso de este último tubo de lava, se tomó una nueva muestra, MZ03-10J, además de MZ03-7G, MZ03-6F y MZ03-8H, ya recogidas en 2015. Como novedad se muestreó el tubo de lava “Búcara II de Montes Luna”, cuyas muestras se denominaron MZ26, de las que únicamente se cultivó una. Las muestras tomadas en esta campaña no fueron destinadas a aislar hongos.

La metodología para el cultivo de las bacterias presentes en cada muestra fue la misma que la empleada para las muestras de la campaña de 2015. Adicionalmente, se empleó el medio de cultivo sólido GYM, específico para *Streptomyces*, y se diseñó un cultivo líquido de enriquecimiento basado en roca volcánica y sub-sustrato gelatinoso tomado de las paredes del punto de muestreo MZ03-10J. Se prepararon 3 cultivos en matraz aforado con la siguiente composición: Matraz 1, 10 gramos de arcilla y 25 gramos de roca, ambas autoclavadas, 100 mL de medio de sales minerales (MVM), adaptado de Sato y colaboradores (2004) y 100 μ L de vitamina B12; Matraz 2, 25

gramos de roca autoclavada, 50 mL de agua destilada, 50 mL de MVM y 100 μ L de vitamina B12; Matraz 3, 25 gramos de roca, 100 mL de TSB y 100 μ L de vitamina B12. Estos matraces fueron inoculados con la muestra MZ03-10J. Durante 4 semanas se fueron sembrando inóculos de 100 μ L de los cultivos líquidos en placas de medio sólido TSA y NA-Mg-G, siguiendo el mismo criterio utilizado para el aislamiento de colonias, descrito en el apartado correspondiente a la campaña 2015.

2.2.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

2.2.3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN DE BACTERIAS

Para llevar a cabo la extracción del ADN de las bacterias aisladas se siguió el método descrito por Griffiths y colaboradores (2000), con algunas modificaciones.

Se recogió biomasa bacteriana con el asa de siembra y transfirió a un tubo de microcentrífuga que contenía 100 μ L de agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Water for Embryo Transfer, Sigma-Aldrich, EE.UU.) o de tampón Tris-NaCl-EDTA (TNE) (10 mM Tris, 28 mM NaCl, 1 mM EDTA; pH 8); se añadieron cuentas de vidrio (Merck), para someter a las células a un lisado mecánico. Una vez resuspendida, la biomasa fue sometida a tres ciclos de congelación/descongelación. Cada ciclo se basa en un choque térmico de -80 °C y 65 °C. La fase de congelación se realizó en un congelador Revco (Revco Scientific Inc. Asheville, Carolina del Norte, EE.UU.), mientras que la fase de descongelación se llevó a cabo en un termoagitador Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Después se aplicó un ciclo de 30 segundos a una velocidad de 4,5 m/s en Fast Prep-24MP (Solon, Ohio, EE.UU.).

A continuación, se añadieron las enzimas lisozima (3,3 μ L, 300 mg/mL, Sigma-Aldrich, EE.UU.) y proteinasa K (10 μ L, 10 mg/mL, Geneon, Alemania) y se incubaron durante toda la noche en un baño de agua a 37 °C. Una vez finalizado este periodo, se añadieron 65 μ L de solución CTAB/NaCl para su incubación durante 10 minutos a 65 °C. La solución CTAB/NaCl es un detergente catiónico que permite separar y, por tanto, eliminar las proteínas y polisacáridos de la solución, obteniendo un ADN más puro. Una vez

finalizado el tiempo de incubación, se añadieron 750 μL de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1, v/v/v, Agros organic, Bélgica), se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos en centrífuga (modelo 5424 de Eppendorf AG, Alemania). Se obtuvieron dos fases inmiscibles de las que se tomó la fase acuosa superior donde se encontraba el ADN. Se desechó la fase fenólica inferior donde quedaban las proteínas y los restos celulares. El siguiente paso consistió en añadir 750 μL de una solución de cloroformo:isomilalcohol (24:1, v/v) a la fase acuosa para eliminar toda traza de fenol, repitiendo el procedimiento de centrifugación. Se recogió la fase acuosa nuevamente en un tubo limpio. Para conseguir la precipitación de ADN se añadieron 75 μL de una solución de acetato de sodio 3 M, pH 7 y 1 mL de etanol absoluto incubando a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. A continuación, cada muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante para seguidamente lavar el ADN con 500 μL de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado de ADN a temperatura ambiente el tiempo necesario para eliminar el exceso de humedad en la muestra. Por último, el ADN se resuspendió entre 30 y 60 μL de agua precalentada a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ libre de nucleasas y ácidos nucleicos (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

2.2.3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN DE HONGOS Y LEVADURAS

El primer paso para la extracción del ADN es similar al llevado a cabo en la extracción de ADN bacteriano. Es decir, partiendo de biomasa fúngica recogida en tubos de 1,5 mL de microcentrífuga a los que previamente se les añadió 250 μL de buffer TNE y cuentas de vidrio (Merck) estériles, se procedió a un lisado físico y mecánico de las células. En primer lugar, se aplicaron tres ciclos de congelación/descongelación ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}/65\text{ }^{\circ}\text{C}$) para finalizar con un ciclo de 30 segundos a una velocidad de 4,5 m/s en Fast Prep-24MP.

Para un mayor rendimiento en la extracción del ADN, se añadió 50 μL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se mezcló agitando los tubos por inversión. Posteriormente se añadió 70 μL de proteinasa K (10 mg/mL), se agitaron e incubaron durante 90 minutos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua.

Los siguientes pasos hasta obtener el ADN puro son idénticos a los descritos en el apartado anterior.

2.2.3.3 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADN

Se cuantificó la concentración y evaluó la calidad del ADN previamente extraído haciendo uso de un espectrofotómetro ND-1000 de Nanodrop (Wilmington, Delaware, EE.UU.), el cual utiliza el software ND-1000 versión 3.8.1. Se midió la cantidad de luz absorbida de longitud de onda 230, 260 y 280 nm, con el fin de evaluar la calidad del ADN extraído interpretando los cocientes A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280} .

El espectro de absorbancia mínima y máxima para el ADN es 230 nm y 260 nm, respectivamente (Kalb y Bernlohr, 1977), mientras que las proteínas absorben principalmente a 280 nm (Teare y col., 1997). Es decir, cocientes obtenidos de A_{260}/A_{280} por encima de 1,8 para muestras de ADN y 2,0 en el caso de ARN, corresponden a muestras puras, al igual que valores que se mueven entre 2,0 y 2,2 cuando observamos los cocientes de A_{260}/A_{230} . Valores inferiores indican la presencia de moléculas contaminantes como proteínas o solventes orgánicos utilizados durante la extracción (Teare y col., 1997).

2.2.3.4 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES ARNr 16S E ITS

La identificación de las cepas bacterianas y fúngicas se realizó mediante el estudio del gen ARNr 16S y el espaciador interno transcrito (ITS), respectivamente. Este análisis se basa en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) de estas regiones del ADN, y posterior secuenciación de la cadena de nucleótidos. La PCR, basada en realizar múltiples copias del segmento genómico deseado, es muy extendida entre la comunidad científica taxonómica, ya que estas regiones del ADN bacteriano y fúngico, muy conservadas, comprenden zonas hipervariables lo cual permite observar diferenciaciones nucleotídicas entre distintas especies. El gen ARNr 16S tienen una longitud de, aproximadamente, 1500 pares de bases y posee 9 regiones hipervariables (Fig. 2.5 A). Los marcadores comúnmente utilizados para la identificación de las especies de hongos y levaduras son los espaciadores internos transcritos

ITS 1 e ITS 2, que son fragmentos no codificantes localizados entre los genes ribosómicos 18S-5,8S y 5,8S-28S (Fig. 2.5 B).

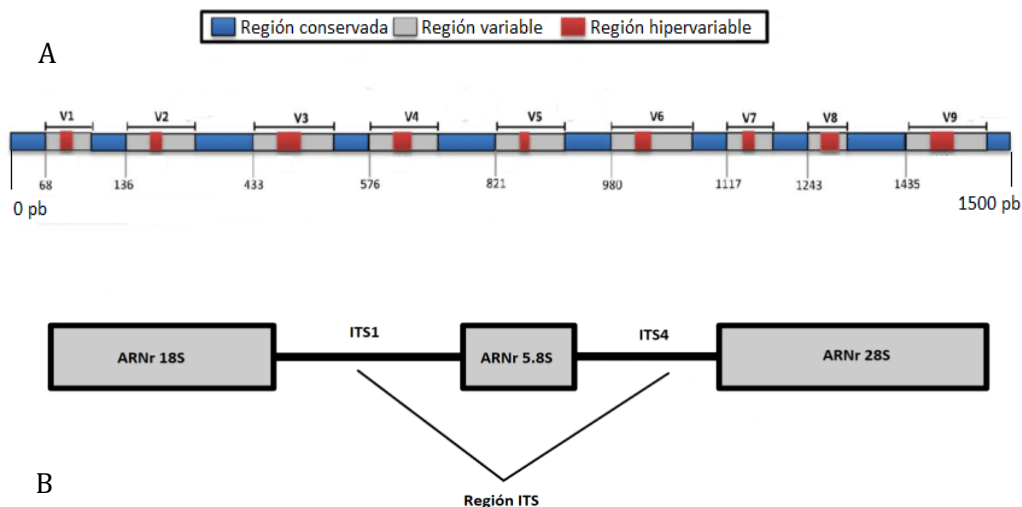


Figura 2.5. A: Estructura de las regiones del gen ARNr 16S . Figura adaptada de Shahi y colaboradores (2017); B: Regiones ITS del gen ARNr en eucariotas.

Cada reacción de PCR se dispuso en tubos de 0,2 mL con una mezcla que contenía 5 μ L de tampón 10X BioTaq (Bioline, EE.UU.), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 5 μ L de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (2 mM) (Invitrogen, EE. UU.), 0,5 μ L de cada uno de los cebadores correspondientes *forward* y *reverse* (50 μ M) (Invitrogen, EE.UU.) (Tabla 2.2), 0,25 μ L de la ADN polimerasa BioTaq (5 U/ μ L) (Bioline, EE.UU.) y 2-20 ng de ADN molde. Para favorecer la afinidad de la enzima polimerasa por la hebra de ADN, se añadió albúmina de suero bovino (BSA) al 10% en proporción 4 μ L por cada 1 mL de mezcla para PCR preparada.

Tabla 2.2. Cebadores empleados en la amplificación y secuenciación del ADN.

Cebadores*	Secuencia	Referencia
Gen ARNr 16S		
616F	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	Juretschko y col., 1998
519F	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	Lane y col., 1985
1492R	5'-GGYTACCTTGTKWCGACTT-3'	Lane, 1991.
1510R	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'	Echigo y col., 2005
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	Giovannoni, 1991
907R	5'-AATTCCTTTGAGTTT-3'	Weisburg y col., 1991
Arch109F	5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'	Luna y col., 2009
Arch509R	5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3'	Luna y col., 2009
Región ITS		
ITS1	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	White y col., 1990
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	Gardes y Bruns, 1993
ITS4	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	White y col., 1990

* F "forward": cebador directo; R "reverse": cebador reverso

El programa del termociclador para las parejas de cebadores 616F-1510R y 616F-1522R, comenzó con una desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos que comprenden 20 segundos de desnaturalización a 94 °C, 20 segundos de reagrupación de oligonucleótidos a 55 °C y 2 minutos de elongación a 72 °C. Finalmente, el proceso termina con un ciclo de extensión a 72 °C durante 2 minutos.

En el caso del programa para amplificación del ARNr 16 utilizando el par de cebadores 616F-1492R, el primer paso de desnaturalización se configuró a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 34 ciclos que constaban de tres pasos: primero se desnaturaliza la cadena de ADN a 95 °C durante 45 segundos, a continuación, se reagrupan los nucleótidos a 47 °C durante otros 45 segundos y por último se produce un periodo de 1,30 minutos para la

elongación. Para finalizar el programa, se continúa con una etapa de extensión de 72 °C durante 10 minutos.

La amplificación de las regiones ITS consiste en la programación de la siguiente configuración del termociclador: primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos compuestos de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, reagrupación de nucleótidos a 50 °C durante 1 minuto y para finalizar, 1 minuto para el paso de elongación. El programa finaliza con 5 minutos de extensión.

La amplificación del segmento del ADN deseado en cada muestra se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) con tampón TAE 0,5X. Para ello se dispuso de un volumen de producto de PCR variable, entre 3 y 5 µL al que se le añadieron 2 µL de SYBR Green I (Molecular Probes, EE.UU.). El SYBR Green I es una tinción altamente sensible en la detección de ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida. La electroforesis se desarrolló en un equipo BioRad Power-Pac Basic (BioRad, EE.UU.), que contenía tampón TAE 0,5X a pH 8,2, conectado a una fuente de alimentación EPS 600 (Amersham Biosciences, EE.UU.) a 90 voltios y 400 mA durante 20-25 minutos.

Los geles se observaron con un transiluminador BioRad (BioRad, EE.UU.), que emite luz ultravioleta a una longitud de onda de 312 nm. El transiluminador incluye un sistema de captación de imágenes y software Image Lab Software 6.0.1 (BioRad, EE.UU.) para su procesado.

2.2.3.5 SECUENCIACIÓN DEL ADN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS

Una vez verificada la amplificación de los fragmentos de ADN, se procedió a su purificación con un kit comercial Jetquick *PCR Product Purification Spin kit* (Genomed, Löhne, Alemania) para eliminar restos de enzima y nucleótidos para evitar interferencia de estos en la secuenciación.

Los productos amplificados y purificados fueron enviados a Secugen (Madrid, España) y Macrogen Europa (Amsterdam, Holanda). Las secuencias generadas se editaron manualmente utilizando el software BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 (Hall, 1999).

La identificación taxonómica de las cepas se realizó con la base de datos EzTaxon-e (Yoon y col., 2017). Esta base de datos reúne aquellas secuencias taxonómicas que han sido previamente curadas, procediendo a la identificación de la secuencia problema mediante alineamiento. Este algoritmo, desarrollado por Myers y Miller (1988), se fundamenta en la búsqueda de secuencias.

Todas las secuencias se actualizaron entre septiembre y diciembre de 2018.

2.2.3.6 ANÁLISIS GENÉTICO DE GENES *MLSA* PARA *STREPTOMYCES SPP*

Debido a su importancia desde el punto de vista biotecnológico, el género *Streptomyces* es muy estudiado. Más de 3000 especies han sido descritas en la literatura desde la década de los años 70. Este hecho unido a la pobre definición de las especies causa sobrespeciación dentro de este género (Guo y col., 2008). Por ello, para ser exhaustivos en la identificación de cepas susceptibles de ser nuevas especies, dentro del género *Streptomyces*, se llevó a cabo un estudio genético complementario al realizado con el gen ARNr 16S. Este análisis se basa en la amplificación y secuenciación de los genes *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *trpB*.

Se estudiaron 3 cepas de *Streptomyces*. Dos de ellas (MZ0337C2 y MZ0348B) presentaban un porcentaje de similitud al límite del 98,7%, umbral establecido para discriminar a dos especies procariotas distintas (Yarza y col., 2014). La tercera cepa (MZ0467C) presentó unos valores de similitud con otros miembros de *Streptomyces* que superaban el umbral fijado, pero difería desde el punto de vista fisiológico de dichas especies, razón por la cual se realizó este análisis.

La reacción de amplificación se llevó a cabo preparando una mezcla con las mismas especificaciones descritas anteriormente para la amplificación del gen ARNr 16S y regiones ITS. En este caso, se utilizaron diferentes cebadores para realizar la amplificación de los cinco genes codificantes descritos. Para la secuenciación, se utilizaron cebadores con secuencias alteradas con respecto a los utilizados en la amplificación (Tabla 2.3), tal y como describieron Guo y col. (2008).

Tabla 2.3. Cebadores empleados en la amplificación y secuenciación de los genes MLSA.

Gen	Función	Cebador (Forward)	Cebador (Reverse)	Referencia
atpD	Amplificación	5'-GTC GGC GAC TTC ACC AAG GGC AAG GTG TTC AAC ACC-3'	5'-GTG AAC TGC TTG GCG ACG TGG GTG TTC TGG GAC AGG AA-3'	Guo y col., 2008
	Secuenciación	5'-ACC AAG GGC AAG GTG TTC AA-3'	5'-GCC GGG TAG ATG CCC TTC TC-3'	
recA	Amplificación	5'-CCG CRC TCG CAC AGA TTG AAC GSC AAT TC-3'	5'-GCS AGG TCG GGG TTG TCC TTS AGG AAG TTG CG-3'	
	Secuenciación	5'-ACA GAT TGA ACG GCA ATT CG-3'	5'-ACC TTG TTC TTG ACC ACC TT-3'	
rpoB	Amplificación	5'-GAG CGC ATG ACC CAG GAC GTC GAG GC-3'	5'-CCT CGT AGT TGT GAC CCT CCC ACG GCA TGA-3'	
	Secuenciación	5'-TTC ATG GAC CAG AAC AAC C-3'	5'-CGT AGT TGT GAC CCT CCC-3'	
trpB	Amplificación	5'-GCG CGA GGA CCT GAA CCA CAC CGG CTC ACA CAA GAT CAA CA-3'	5'-TCG ATG GCC GGG ATG ATG CCC TCG GTG CGC GAC AGC AGG C-3'	Rong y col., 2009
	Secuenciación	5'-GGC TCA CAC AAG ATC AAC AA-3'	5'-TCG ATG GCC GGG ATG ATG CC-3'	
gyrB	Amplificación	5'-CTC GAG GGT CTG GAC GCG GTC CGC AAG CGA CCC GGT ATG TA-3'	5'-GAA GGT CTT CAC CTC GGT GTT GCC CAG CTT CGT CTT-3'	
	Secuenciación	5'-GCA AGC GAC CCG GTA TGT AC-3'	5'-GAG GTT GTC CTT CTC GC-3'	

El programa de amplificación de los genes MLSA consistió en una primera fase de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 3 fases cada uno: primero se desnaturaliza la cadena de ADN a 95 °C durante 30 segundos, a continuación, se reagrupan los nucleótidos a temperatura variable dependiendo del gen que estemos amplificando: atpD, 63 °C; gyrB, 65 °C; recA, 60 °C; rpoB, 65 °C; trpB, 65 °C. Esta fase tuvo una duración de otros 30 segundos. La última fase del apartado de ciclos se somete a 72 °C durante 1,30 minutos para la elongación. Para finalizar el programa, se lleva a cabo con una etapa de extensión de 72 °C durante 10 minutos.

2.2.3.7 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias fueron tratadas individualmente para valorar su calidad y eliminar ruido en el código de nucleótidos a través de BioEdit Sequence Alignment. Las secuencias forward y reverse fueron alineadas y ensambladas para su clasificación recurriendo a la base de datos específica de *Streptomyces* (Streptomyces MLST Databases, University of Oxford, <https://pubmlst.org/streptomyces/>). En este sitio web donde se almacenan más de 1000 secuencias y 270 aislados, se clasificó cada uno de las secuencias de estos genes, incluido el gen ARNr 16S, dando como resultado un código numérico que se corresponde con el perfil de secuencia más próximo en la base de datos. Una vez clasificados cada uno de los 6 genes, se busca la identificación definitiva de la especie a través de la combinación del loci con el siguiente orden: ARNr 16S, atpD, gyrB, recA, rpoB y trpB. Como resultado, la consulta a la base de datos dará los aislados más cercanos a la cepa problema, coincidiendo el código identificativo de cada secuencia de cada gen estudiado, si estamos ante una misma especie. En el caso de observar diferencias en la clasificación de los genes, estaríamos ante una cepa de *Streptomyces*, susceptible de ser nueva especie.

2.2.4 ESTUDIOS DE DETERMINACIÓN DE NUEVA ESPECIE BACTERIANA

Cuando se observó variabilidad en la clasificación del loci, se procedió a realizar un análisis basado en la construcción de árboles filogenéticos con las secuencias del gen ARNr 16S, que ayudaría a obtener aquellas cepas filogenéticamente más próximas.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron los algoritmos de “Máxima Parsimonia” (Maximun Parsimony, MP; Farris, 1970), “Máxima Verosimilitud” (Maximun likelihood, ML; Fisher, 1922) y “Unión del Vecino” (Neighbor-joining, NJ, Saitou y Masatoshi Nei, 1987) usando el programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6.0; Tamura y col., 2013). Para estimar el peso relativo que tenían cada una de las ramas del árbol, se realizó un análisis aleatorio o test “bootstrap” (Felsenstein, 1985) con 1000 repeticiones.

Las cepas MZ0337C2 y MZ0348B fueron comparadas con las especies filogenéticamente más cercanas, *Streptomyces palmae* JCM 31289^T, *Streptomyces ramulosus* NRRL B-2714^T y *Streptomyces catenulae* NRRL B-2342^T, mientras que la cepa MZ0467C se comparó con *Streptomyces aureus* NBRC 100912^T, *Streptomyces durmitorensis* MS405^T, *Streptomyces longisporoflavus* NBRC 12886^T y *Streptomyces kanamyceticus* NBRC 13414^T. Todas las cepas fueron adquiridas de la colección alemana DSMZ (*Leibniz Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, GmbH, Alemania), a excepción de *S. palmae* que se adquirió de la colección japonesa JCM (*Japan Collection of Microorganisms*).

Cada bacteria fue originalmente cultivada en el medio apropiado según las especificaciones indicadas por las colecciones. Para las cepas obtenidas de la colección alemana se utilizó medio GYM y medio Agar levadura-almidón para *S. palmae*. Los cultivos iniciales se dejaron incubar entre 24 y 48 horas a 30 °C. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. En este caso MZ0467C y las especies a comparar se sembraron en el medio de aislamiento original de esta cepa, NA-Mg-G MZ0337C2 y MZ0348B junto con las especies a comparar crecieron en medio ISP 2 (Shirling y Gottlieb, 1966). Se eligió este medio debido al defectuoso crecimiento de *S. palmae* en el medio de aislamiento de las cepas de estudio. Puesto que ISP 2 es el medio utilizado por Sujarit y colaboradores (2016) para caracterizar a esta especie de *Streptomyces*, se decidió estandarizar las siembras de MZ0337C2, MZ0348B, *S. palmae*, *S. catenulae* y *S. ramulosus* utilizando el citado medio de cultivo. El cultivo de MZ0467C se incubó durante 72 horas. Los cultivos de MZ0337C2 y MZ0348B se incubaron durante 24-48 horas.

En los siguientes apartados se detallan las pruebas fisiológicas, morfológicas y quimiotaxonómicas realizadas para la caracterización de una nueva especie bacteriana.

2.2.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FISIOLÓGICA

Temperatura de crecimiento

Los microorganismos se inocularon por duplicado a diferentes temperaturas, 5, 10, 35, 37 y 40 °C durante 14 días. Previamente a las

inoculaciones, las placas se incubaron a las diferentes temperaturas para que el medio de cultivo tuviese la temperatura adecuada de incubación.

Halotolerancia

La tolerancia a sales por parte de las cepas se ensayó a diferentes concentraciones, entre 0 y 15% de NaCl (p/v). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 21 días.

Morfología de las colonias

La morfología y el tamaño de las colonias se examinaron entre 2 y 7 días de crecimiento en los medios de cultivos a 30 °C.

Prueba de la oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de la enzima Citocromo C oxidasa en las bacterias de estudios mediante la Prueba de la Oxidasa. Esta proteína se localiza en la membrana lipídica y está involucrada en la última fase de la cadena transportadora de electrones, catalizando la oxidación del citocromo C mientras reduce el oxígeno para formar agua. En la Prueba de la oxidasa se utiliza un reactivo (tetra-metil-p-fenilendiamina dihidrocloruro) que funciona como donador de electrones artificial para el citocromo C. Cuando el reactivo es oxidado por citocromo C, este cambia de un estado incoloro a una coloración púrpura o azul oscuro que se puede observar a vista normal (Steel, 1961; Lányi, 1987).

Se utilizó un kit comercial de la compañía BioMérieux (Francia). La prueba consistió en añadir una gota del reactivo a un disco de papel de filtro donde se había extendido la biomasa con un asa de siembra. Inmediatamente se vierte una gota del reactivo sobre la biomasa. El test positivo presentará una reacción de coloración púrpura a los 40 segundos de añadir el reactivo. El test negativo quedará incoloro. Para interpretar los resultados se utilizó un control positivo (*Pseudomonas aeruginosa*) y un control negativo (*Escherichia coli*).

Metabolismo de fuentes de carbono simples

La utilización de diferentes fuentes de carbono por parte de las bacterias se monitorizó mediante cultivos sólidos en medio mínimo con sales más la adición de 1% (p/v) de la fuente de carbono a ensayar (Miller, 1992). Las fuentes de carbono empleadas fueron sacarosa, maltosa, dextrano, manosa, glicerol, lactosa, D-galactosa, xilosa, fructosa, mio-inositol, glucosa y manitol.

La siembra se hizo por duplicado y la incubación se llevó a cabo a 30 °C monitorizando la evolución de los cultivos durante 7-10 días.

Ensayos de asimilación y pruebas bioquímicas

La galería API 20 NE (BioMérieux, Francia) se utilizó para el estudio de asimilación de 12 compuestos y 8 ensayos bioquímicos convencionales. Esta galería contiene 20 microtubos con sustratos deshidratados Fig. 2.6).

El procedimiento consistió en la preparación de una solución salina de NaCl 0,85% (p/v) a la que se le añadió biomasa de cada bacteria, cultivada entre 24-72 horas, hasta alcanzar una turbidez igual a 0,5 de la galería estándar de McFarland (BioMérieux, Francia). Cada microtubo se inoculó con esta solución para observar la reacción producida entre la biomasa y los sustratos traducida en la aparición de coloración, que, de acuerdo al código de colores presentado por la galería, se determinó como prueba positiva o negativa.

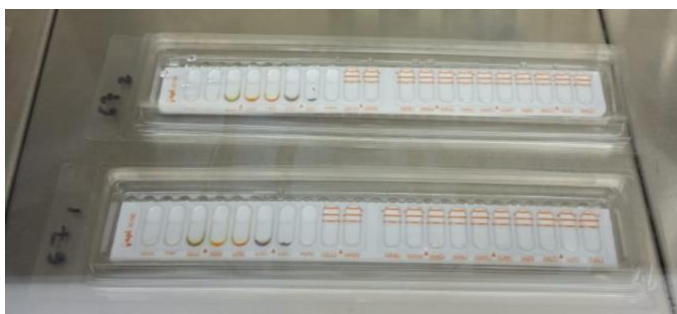


Figura 2.4. Galerías API 20 NE.

La reducción de nitrato (NO_3) se comprobó con la aplicación de 1 gota de reactivo NIT 1 y 1 gota de reactivo NIT 2 (BioMérieux, Francia) a cada uno de los microtubos de la galería API 20 NE. La aparición de un color rojo pasados 5 minutos indicará una reacción positiva. La no aparición de la tonalidad roja puede deberse a la incapacidad para descomponer el nitrato o bien por la producción completa de nitrógeno, circunstancia que producirá burbujas fácilmente apreciables. Si no aparece esta coloración, se le añaden 2-3 mg de zinc en el microtubo de NO_3 . Si tras 5 minutos la cúpula es incolora, la prueba será positiva, si torna rosa-rojo, la prueba será negativa.

El ensayo del triptófano es una prueba bioquímica utilizada para determinar la capacidad de la bacteria para reducir indol a partir de triptófano por mediación de la enzima triptofanasa. Este ensayo parte de la adición de una gota de reactivo James (BioMérieux, Francia) en el microtubo. La difusión de un color rosa indicará una reacción positiva.

La reacción por fermentación de la D-glucosa, la presencia de las enzimas arginina dihidrolasa y ureasa, así como las reacciones de hidrólisis de esculina mediante la β -galactosidasa, la hidrólisis por proteasa y la presencia de la enzima β -galactosidasa (para-nitrofenil- β D-galactopiranosidasa), son ensayos de inmediatos resultados.

El resto de microtubos se correspondían con los ensayos de asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido adípico, malatasa, citrato trisódico y ácido fenilacético. Estos ensayos de asimilación se incubaron a 30 °C y se monitorizaron durante 14 días para comprobar su evolución.

Prueba ISP (International Streptomyces Project)

Para comprobar la capacidad de crecer en determinadas condiciones de nutrientes, así como la posibilidad de difundir pigmentos y otras características fisiológicas de las cepas de *Streptomyces*, se utilizaron medios de cultivo del Proyecto Internacional para *Streptomyces* recomendados por Shirling y Gottlieb (1961)

Las distintas cepas se cultivaron en los medios ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 y ISP7, y se incubaron a 30 °C durante 7-10 días.

2.2.4.2 CARACTERIZACIÓN QUIMIOTAXONÓMICA

Análisis del ácido diaminopimélico (DAP)

La composición de la pared celular se utiliza para la caracterización de las bacterias Gram-positivas debido a su variedad. El ácido 2,6-diaminopimélico es un aminoácido derivado de la lisina presente en la pared celular de las bacterias. El primer paso en el análisis de la pared celular de las bacterias Gram-positivas es la detección e identificación de los isómeros del DAP (LL-DAP, DD-DAP y meso-DAP). En el género *Streptomyces*, la variante principal es la LL-DAP.

Para la detección de los ácidos diaminopimélicos se envió la biomasa bacteriana a los servicios de identificación del DSMZ (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Alemania), concretamente al servicio de Análisis DAP (ácido 2,6-diaminopimélico). Estos análisis se realizaron usando el sistema de Rhuland y colaboradores (1955).

Ácidos grasos

Los ácidos grasos de los microorganismos son parte de la estructura de la membrana celular. Las células alteran la composición de ácidos grasos de sus lípidos para mantener la fluidez de la membrana cuando cambian las condiciones ambientales. Es muy importante controlar la selección de un medio de cultivo, el tiempo y la temperatura de incubación antes de analizar la composición de los ácidos grasos de la célula.

El estudio de la composición de los ácidos grasos se realizó mediante el sistema de identificación MIDI (Newark, Delaware, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el desarrollo de este protocolo se necesitaron cultivos en fase logarítmica tardía. Por este motivo, se emplearon cultivos de 24-48 horas de crecimiento a 30 °C. Se recogieron 40 mg de biomasa bacteriana en tubos de vidrio (Pyrex) y se procedió a la saponificación. En este primer paso, la solución metanol-hidróxido de sodio combinado con calor lisa las células liberando los ácidos grasos. Estos ácidos grasos se escinden de los lípidos celulares y se convierten en sus sales de sodio. Para este paso, se añadió 1 mL del Reactivo 1, se agitó unos segundos

con el vórtex (Heidolph, Alemania) e incubó 5 minutos en un baño de agua a 100 °C. Seguidamente, se volvió a agitar con el vórtex durante 5-10 segundos y se volvió a incubar 25 minutos a 100 °C, pasado este tiempo se enfriaron los tubos en agua. El segundo paso, fue la metilación que convierte los ácidos grasos (como las sales de sodio) en ésteres metílicos de ácidos grasos, lo que aumenta la volatilidad de los ácidos grasos para el análisis en el cromatógrafo de gases; en este paso, se le añadieron 2 mL del Reactivo 2 a cada tubo y se incubó a 80 °C en un baño de agua Grant GD100 (Grant, Inglaterra) durante 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se enfriaron los tubos a un baño con agua fría. El tercer paso, se corresponde con la extracción, en ella los ésteres metílicos de los ácidos grasos se eliminaron de la fase acuosa y se transfirieron a una fase orgánica con un procedimiento de extracción líquido-líquido. Para ello, se añadieron 1,25 mL del Reactivo 3 y posteriormente se agitó en el rotor (Heidolph reax 2, Alemania) a una velocidad de 2,5 m/s durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se retiró la fase inferior del tubo dejando la fase superior. En el cuarto y último paso, se añadieron 3 mL del Reactivo 4. Esta solución se utiliza para eliminar los ácidos grasos libres y reactivos residuales del extracto orgánico. Se agitó en el mismo rotor durante 5 minutos en las mismas condiciones anteriormente descritas. Pasado este tiempo, se añadieron unas gotas de una solución saturada de NaCl y agua para ayudar a romper la emulsión, se dejó reposar durante unos minutos para que se separaran las fases acuosa y orgánica. Finalmente, se transfirió 2/3 de la fase orgánica (superior) del tubo a un vial de vidrio (Agilent-Technology, EE.UU.) y se selló el vial de manera hermética para evitar la evaporación de la muestra.

Una vez extraídos los ácidos grasos de las muestras, se analizaron por triplicado empleando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Hewlett-Packard, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice [25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, fenil metil silicona (Ultra-2 Hewlett-Packard)]. El gas portador fue el hidrógeno. Las condiciones de temperatura fueron desde 170 °C a 260 °C, con una rampa de 5 °C al minuto. La temperatura del inyector fue de 260 °C, mientras que la del detector fue de 280 °C.

2.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS

Las tres cepas pertenecientes al género *Streptomyces* que se describirán como nuevas especies (MZ0467C, MZ0367C2, MZ0348B) se ensayaron en medio sólido para determinar si producían algún tipo de sustancia inhibidora del crecimiento bacteriano o fúngico. Se diseñaron 5 ensayos, y de forma complementaria se aplicaron los ensayos 3 y 5 al resto de cepas *Streptomyces* aisladas en la presente Tesis.

2.3.1 ENSAYO CON BACTERIAS

En la primera aproximación se tomaron cepas aisladas en el presente trabajo, clasificadas en distintos grupos taxonómicos (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Cepas clasificadas en distintos géneros de los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*, aisladas durante la presente tesis doctoral, utilizadas para determinar la capacidad productora de compuestos antimicrobianos por parte de las cepas MZ0467C, MZ0367C2 y MZ0348B.

Filo	Género	Muestra	Cepas
Actinobacteria	<i>Pseudarthrobacter</i>	MZ04-2B	MZ0459B2
	<i>Arthrobacter</i>	MZ04-2B	MZ0430B1
	<i>Microbacterium</i>	MZ04-2B	MZ0435B
	<i>Rhodococcus</i>	MZ04-2B	MZ0482B y MZ0480B1
	<i>Streptomyces</i>	MZ04-3C	MZ0421C
	<i>Kocuria</i>	¹ Otras	-
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	MZ04-2B	MZ0429B
	<i>Pseudomonas</i>	MZ04-2B	MZ0481B
	<i>Cupriavidus</i>	MZ04-3C	MZ0462C
	<i>Sphingomonas</i>	MZ04-3C	MZ04101C
	<i>Escherichia</i>	² Otras	-
Firmicutes	<i>Paenibacillus</i>	MZ04-2B	MZ0478B1 y MZ0478B2

¹ Bacteria aislada en un tubo de lava de un estudio independiente.

² Bacteria de colección CECT 443.

Se llevó a interactuar a cada una de las cepas asociadas a los grupos taxonómicos descritos en la Tabla 2.4 con las cepas de *Streptomyces* objetivo de este estudio (Fig. 2.7). Para tal efecto, se recogió biomasa realizando una

descarga en la zona opuesta a la cepa a interactuar, arrastrando la biomasa hacia un punto de influencia de ambas cepas. Se utilizó una zona de la placa como control del crecimiento de cada cepa a inhibir sin interactuar con las cepas del género *Streptomyces* del estudio.

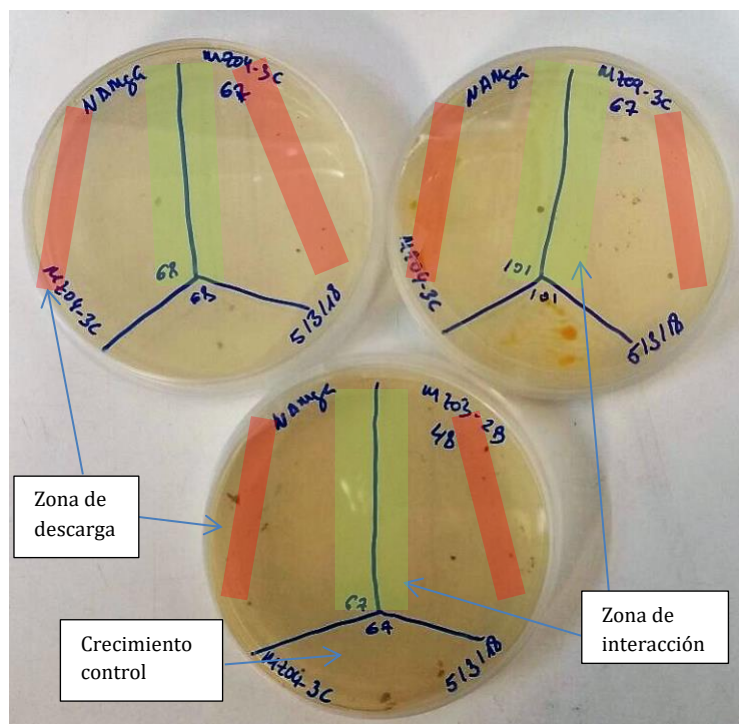


Figura 2.7. Metodología seguida para el primer ensayo de inhibición de las cepas de *Streptomyces* objeto de estudio.

En un segundo ensayo, cada bacteria productora seleccionada se sembró por estría en un lado de la placa y se incubó 24-48 h a 30 °C con objeto de permitir la difusión del antibiótico o biocompuesto producido. Una vez crecida la cepa productora, se sembraron por estría las cepas indicadoras posiblemente susceptibles, de tal forma que pudiesen visualizarse claramente zonas de inhibición de crecimiento.

Para el tercer ensayo se dispuso de placas Petri con medio TSA a las que se le añadió un inóculo de cultivo líquido de las cepas de los géneros *Pseudarthrobacter*, *Microbacterium* y *Sphingomonas*, descritas en la Tabla

2.4, además de una cepa de colección de *Escherichia coli* CET 433 y la cepa del género *Kocuria* no aislada en este estudio. Se prepararon inóculos incubados entre 24 y 48 horas hasta alcanzar una turbidez igual a 2 de la galería estándar de McFarland (BioMérieux, Francia) en medio TSB y se mantuvieron a 4 °C durante un mes. Periódicamente, a partir de los inóculos anteriores, se prepararon cultivos de 7 mL de TSB para su utilización en la preparación de placas de Petri con 30 mL de medio TSA que contuviesen dichos cultivos de las cepas indicadoras (Tabla 2.5). El volumen de TSA utilizado fue ajustado empíricamente para alcanzar el grado de saturación necesario para el crecimiento uniforme de cada bacteria en placa.

Tabla 2.5. Bacterias utilizadas para la preparación de placas de cultivo con TSA.

Bacterias	Tiempo incubación	Temperatura incubación	RPM	Volumen TSA
<i>Microbacterium</i>	48 horas	30 °C	250	100 mL
<i>Arthrobacter</i>	48 horas	30 °C	250	200 mL
<i>Pseudarthrobacter</i>	48 horas	30 °C	250	200 mL
<i>Sphingomonas</i>	24 horas	30 °C	250	200 mL
<i>Kocuria</i>	48 horas	30 °C	250	200 mL
<i>Escherichia</i>	24 horas	37 °C	250	150 mL

Las placas de cultivo fueron ajustadas a un volumen de 30 mL y, una vez solidificaron, se recortaron tacos de 0,5 mm de diámetro de cultivo sólido en NA-Mg-G de la cepa de *Streptomyces sp.* MZ0467C susceptible de ser nueva especie que presentó características inhibitorias de crecimiento de otras bacterias utilizadas en el ensayo anterior (Fig. 2.8). Para comprobar la viabilidad inhibitoria de la cepa, se utilizaron distintos tiempos de cultivo. Concretamente se utilizaron cultivos con 3, 10 y 30 días de crecimiento, para observar si había ausencia o formación de halo. Como control positivo, se utilizó una cepa de colección de *Streptomyces coelicolor* A3(2), puesto que es la especie genéticamente mejor caracterizada y por su capacidad para producir de diferentes tipos de antibióticos (Bibb, 1996).

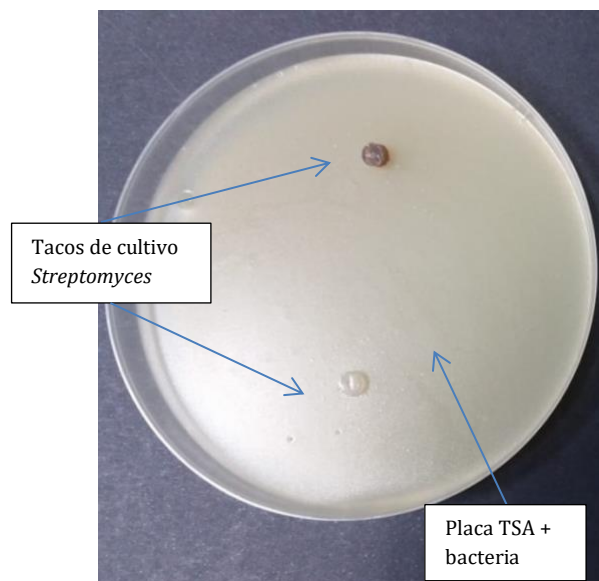


Figura 2.8. Metodología seguida para el tercer ensayo de inhibición utilizando secciones circulares de cultivos de las cepas de *Streptomyces* objeto de estudio.

El cuarto ensayo se basó en comprobar la influencia del glicerol y del NaCl para producir biocompuestos antibacterianos. Existen precedentes que sitúan al glicerol como un nutriente que promueve o fomenta la producción de compuestos antimicrobianos y antifúngicos (El-Banna, 2005; Shekar y col., 2011), así como estudios que relacionan la presencia de NaCl con la reducción de producción de compuestos antibióticos (Verluyten y col., 2004). De esta forma, se probó el comportamiento de *Streptomyces* sp. MZ0467C sembrados en medios TSA con diferentes configuraciones de nutrientes adicionales: TSA, TSA-Na-Mg, TSA-Na-Mg-G, TSA-G. Se implementó la misma metodología utilizada en el tercer ensayo.

2.3.2 ENSAYO CON HONGOS

La finalidad del quinto ensayo fue comprobar la capacidad de *Streptomyces* de inhibir el crecimiento de cinco cepas de hongos aisladas en la presente tesis doctoral (*Penicillium pancosmium*, MZ03-2B; *Cladosporium* sp., MZ03-2B; *Pochonia bulbillosa*, MZ03-3C; *Aspergillus sydowii*, MZ04-2B; *Trichoderma inhamatum*, MZ03-8H).

El procedimiento seguido consistió en la siembra en placas de NA-Mg-G de las cepas de hongos descritas. Se situaron las bacterias de estudio de forma que, virtualmente, se pudiera trazar un triángulo isósceles uniendo a modo de vértices las tres cepas bacterianas, localizándose el hongo en la zona central de la placa (Fig. 2.9).

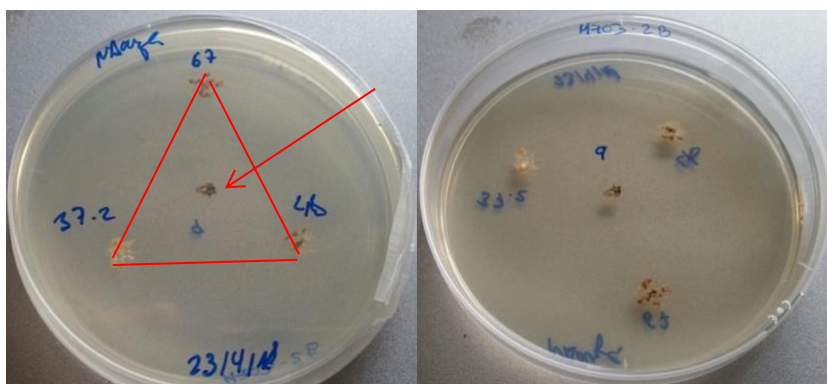


Figura 2.9. Ensayo para analizar la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas de hongos por cepas del género *Streptomyces*.

Los cultivos se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 28 días para observar la evolución del desarrollo del hongo en presencia de las distintas cepas de *Streptomyces*.

2.4 SECUENCIACIÓN DE GENOMAS COMPLETOS

La secuenciación del genoma completo es una metodología basada en el análisis de los genomas de los organismos para el estudio de su perfil funcional y comparar con genomas de especies cercanas con el fin de identificarlas como nuevas especies. Este método utiliza técnicas de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación (NGS). Al contrario que la secuenciación Sanger, la NGS permite obtener un elevado número de lecturas o *reads* de forma paralela y en un tiempo reducido. Es decir, como resultado final se puede obtener 100 o incluso 1000 veces más de secuencias usando esta técnica, con respecto a la secuenciación Sanger.

Se utilizó la plataforma de secuenciación Illumina (California, EE.UU.), basada en la fragmentación, amplificación por PCR y posterior secuenciación del ADN en lecturas o *reads* cortas pareadas (*Paired-End*) de 250 pares de bases. En la secuenciación de lecturas cortas paired-end se obtienen dos lecturas, una por cada extremo del fragmento de ADN. Estas lecturas, provenientes del mismo fragmento, se denominan *mates*. La secuenciación de los genomas de las cepas MZ0467C, MZ0337C2 y MZ0348B se realizó en la compañía MicrobesNG (Universidad de Birmingham, Reino Unido). El análisis de calidad, filtrado de lecturas crudas y ensamblado de los genomas de las bacterias fue realizado por esta misma empresa.

2.4.1 EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

La secuenciación del genoma completo se realizó en aquellas bacterias susceptibles de ser nuevas especies. Se extrajo el ADN genómico de dichas bacterias aplicando el método descrito por Marmur (Marmur, 1961) modificado.

Se resuspendió la biomasa bacteriana procedente de cultivos sólidos con 24-72 horas de incubación, según la cepa, en 1 mL de tampón Tris-NaCl-EDTA (TNE) en tubos de microcentrífuga de 2 mL. Inmediatamente se añadieron tres enzimas que hidrolizan la pared celular y digieren proteínas. Concretamente, se añadieron 3,3 μ L de lisozima a 300 mg/mL, 10 μ L de mutanolisina a 1000 unidades/mL y 10 μ L de proteinasa K a 10 mg/mL. La mezcla fue agitada brevemente en vórtex FineVortex e incubada a 37 °C en un baño de agua Grant GD100 durante toda la noche.

Al día siguiente, los tubos con la biomasa fueron sometidos a dos ciclos de congelación/descongelación (-80 °C /65 °C), en congelador Revco y termoagitador Thermomixer 5436. Posteriormente, se añadieron 80 μ L de solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 25% y se mezcló agitando en vórtex. Seguidamente se incubaron en baño de agua durante 10 minutos a una temperatura de 65 °C. Al finalizar este periodo se añadieron 250 μ L de solución de NaCl 5M y se mezclaron por inversión. En este punto el volumen total de los tubos de cada cepa se repartió para obtener un volumen aproximado de 670 μ L en cada tubo. A continuación se añadieron 670 μ L de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1, v/v/v) (Acros Organics, Geel, Bélgica) por cada tubo y se mezcló por inversión. Se centrifugaron a 13.000

rpm en una centrifuga marca Eppendorf (modelo 5424) durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante o fase acuosa descartándose la fase orgánica o fenólica. A la fase recuperada se le añadieron 670 μL de cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v) (Acros Organics), se agitó por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Como en el paso anterior, se procedió a recuperar en nuevo tubo la fase acuosa (superior) para descartar la fase orgánica.

Para los siguientes pasos se mezclaron los sobrenadantes de todos los tubos de cada cepa y se procedió a la precipitación del ADN añadiendo 0,1 volúmenes de solución acetato de sodio 3M a pH 7, y 0,6 volúmenes de isopropanol. La mezcla se agitó por inversión y se dejó precipitar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche.

El ADN precipitado y observado a simple vista, se recogió con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio con la punta quemada y se situó de forma vertical con el ADN en la parte superior para su secado. Si el ADN no se distinguía a simple vista, se procedió a centrifugar el tubo a 13.000 rpm durante 20 minutos. Descartándose el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 μL de etanol al 70% (v/v), se agitó y centrifugó durante 4 minutos a 13.000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente el tiempo necesario hasta observar ausencia de excesiva humedad. En todos los casos, el ADN se resuspendió en 100-500 μL agua (Sigma-Aldrich), dependiendo de la cantidad de este.

Para obtener un ADN lo más puro posible se llevó a cabo un tratamiento de eliminación del ARN que pudiera resistir tras el proceso. Para tal efecto se añadió una mezcla de RNasa A/T1 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y tampón salino de citrato de sodio (SSC) 10X y se incubó en baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una hora. Posteriormente, se añadió un volumen igual al utilizado cuando se resuspendió el ADN en agua, de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1, v/v/v). Se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. De nuevo, a la fase acuosa recuperada se le añadió el mismo volumen que la solución orgánica anterior, pero en este caso de cloroformo:isoamilalcohol (24:1, v/v).

El ADN se dejó precipitar toda la noche tras añadir acetato de sodio 3M y pH 7, junto con isopropanol. Al día siguiente, dependiendo si se podía observar a simple vista la presencia de ADN o no, se recuperó el ADN de la

misma forma que se ha descrito con anterioridad. Se dejó secar el ADN a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen no inferior a 30 μL de tampón EB (10mM Tris-HCl). El ADN se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su envío a la compañía de secuenciación.

El último paso antes enviar el ADN a la empresa de secuenciación fue comprobar que la concentración de ADN se encontraba dentro de los márgenes solicitados por MicrobesNG. Para tal efecto, se utilizó un fluorímetro Qubit® 2.0 de Invitrogen (Life Technologies, Singapur), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se ajustaron a una concentración de entre 10 ng/ μL y 30ng/ μL , con un volumen final de entre 30 y 50 μL .

2.4.2 PROCESADO BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENOMAS

El procesado se llevó a cabo haciendo uso del servicio del clúster de supercomputación del Centro Informático Científico de Andalucía (CICA) de la Consejería de Conocimiento, Investigación y Universidad de la Junta de Andalucía. Este servicio dispone de más de 60 nodos con más de 600 núcleos para uso de los centros de investigación radicados en la comunidad autónoma de Andalucía. La gestión de sus recursos viene regida por el programa Sun Grid Engine (SGE), el cual distribuye los trabajos lanzados por los usuarios según la necesidad de recursos que necesiten sus procesos. En la presente Tesis doctoral se utilizaron dos marcos de trabajo distintos, según las necesidades de carga de cada trabajo, que fueron “Trabajos simples”, para ejecuciones de programa con bajas necesidades de recursos en las que se asignó un solo nodo por parte del clúster, y “Trabajos paralelos multiprocesador”, para procesos más pesados que requerían el manejo de una gran cantidad de datos. En este último caso la asignación de recursos dependía del usuario y su disponibilidad en el clúster.

2.4.2.1 FILTRADO DE CONTIGS

El borrador del genoma establecido con las secuencias ensambladas se filtró para eliminar secuencias con una longitud mínima y *coverage* o

cobertura mínima. El *coverage* hace referencia al número total de lecturas que contiene uno o varios nucleótidos en una posición determinada del fragmento de ADN, de este modo, si se obtiene un *coverage* muy bajo, podríamos estar ante un error en la secuenciación que habría que descartar.

Así pues, se procedió en primer lugar a filtrar por longitud de la secuencia y *coverage*, lanzando el siguiente comando por el intérprete de comandos de Linux:

```
grep -F ">" archivo_SPAdes.fasta | sed -e 's/_/ /g' | sort -nrk 6 | awk '$6>=2.0 && $4>=500 {print $0}' | sed -e 's/ /_/g' | sed -e 's/>/ /g' > filtrado.fasta
```

Se utilizaron los comandos de filtrado *grep*, *sed* y *awk*, donde el *archivo_SPAdes.fasta* representó el fichero obtenido tras el ensamblado con el software SPAdes y '*\$6>=2.0 && \$4>=500 {print \$0}*' representó el filtrado para aquellas secuencias con un *coverage* inferior a 2 y con una longitud superior a 500 pares de bases.

2.4.2.2 COMPARACIÓN DE GENOMAS CON JSPECIES: ANÁLISIS IN SILICO DE NUEVA ESPECIE.

Los genomas de las bacterias secuenciadas fueron comparados con los genomas de las especies más cercanas para corroborar la categoría de nueva especie haciendo uso del software JSpecies. Esta herramienta web realiza una simulación computación comparativa entre un mínimo de 2 genomas con el objetivo de esclarecer la identidad mediante la similitud de dichos genomas. Este servicio analiza la identidad del promedio de nucleótidos o ANI, del inglés "average nucleotide identity", utilizando el algoritmo BLAST+ (ANiB) (Camacho y col., 2008) y MUMmer (ANIm) (Kurtz y col., 2004), así como mediante índices de correlación TETRA (Teeling y col., 2004b), para llevar a consenso la determinación, o no, de nueva especie bacteriana a través del resultado de los tres algoritmos. Los índices TETRA utilizan frecuencias de tetranucleótidos para determinar si el genoma objeto de estudio está por encima o por debajo del umbral que determina si se trata de la misma especie del genoma con el que se compara. Si está por encima, los valores ANiB y ANIm deciden si es o no una nueva especie y, si está por debajo, se asume directamente que es una nueva especie. Y, por otro lado, las frecuencias de tetranucleótidos, se utilizan para predecir a qué o cuales

genomas disponibles en las bases de datos se encuentra más próximo el genoma estudiado (TCS).

Este estudio sustituye a la hibridación ADN-ADN, técnica utilizada originalmente para determinar si una cepa era nueva especie o no. Las evidencias empíricas basadas en la clasificación de especies y su comparación a través de la técnica de hibridación, sugirieron que aquellas cepas que estuviesen por debajo del 70% de reasociación en la hibridación de ADN, se considerarían nuevas especies. No obstante, la evaluación continua a lo largo de los últimos años ha determinado que este umbral es variable dependiendo del grupo a estudiar (Rosselló-Mora, 2006).

2.4.2.3 PREDICCIÓN DE GENES

Para la predicción de genes a través del ensamblado del genoma completo, se utilizó la herramienta *Prodigal* (Hyatt y col., 2010), basada en la búsqueda de posibles marcos de lectura abierta o *ORF's*, de su acrónimo en inglés. Es decir, *Prodigal* localiza los codones de comienzo y fin para delimitar la predicción del gen. La ejecución del programa comprendió la siguiente configuración:

```
prodigal -a proteinas.fasta -d nucleotidos.fasta -i genoma.fasta -o archivo.gff -f gff
```

Donde:

- *prodigal*
Comando principal de la herramienta.
- *-a proteinas.fasta*
Parámetro de predicción de genes con secuencias de aminoácidos.
- *-d nucleotidos.fasta*
Similar al anterior, con secuencia nucleotídica.
- *-i genoma.fasta*
Archivo de entrada, contiene la información del ensamblado filtrado.
- *-o archivo.gff*
Archivo de salida de ejecución del programa.
- *-f gff*
Formato del archivo de salida. GFF es el formato ideado por el proyecto Ensembl, del Centro Sanger, para aunar información

genética de organismos eucariotas y procariotas. Este formato comprende una serie de campos que ofrecen la información necesaria para caracterizar el fragmento o gen descrito.

2.4.2.4 ANÁLISIS DE ANOTACIONES DE LOS GENES PREDICHOS

Se procedió a dotar de caracterización funcional a los genes predichos a través de distintas herramientas basadas en homología de las secuencias con el contenido existente en diferentes bases de datos. Se utilizó el software Sma3s (Muñoz-Mérida y col., 2014; Casimiro-Soriguer y col., 2017) que realiza un análisis funcional de proteínas para identificarlas según la función molecular que realizan, los procesos biológicos en los que participan y en qué región de la célula desempeñan su función. Sma3s proporciona un informe detallado con aquellos genes predichos a los que se les ha encontrado anotaciones de acuerdo a las entradas homólogas en la base de datos utilizada. Para este fin, se utilizó la base de datos de bacterias revisada SwissProt descargada desde el repositorio de Uniprot (The UniProt Consortium, 2018).

Este software se ejecutó en la plataforma CICA a través del siguiente comando:

```
sma3s_v2.pl -i proteinas.fasta -d DataBase -b blast.out -uniprot
```

Donde:

- *sma3s_v2.pl*
Comando principal de ejecución de la herramienta.
- *-i proteinas.fasta*
Archivo que contiene las secuencias de aminoácidos predichas por prodigal en formato fasta.
- *-d DataBase*
Directorio donde se localiza la base de datos utilizada.
- *-b blast.out*
Ruta para el fichero de salida de la ejecución de *Blast* donde se presentaron los códigos de las fichas de UniProt de cada proteína y el valor de significancia, que indica cómo de certero ha sido la identificación.
- *-uniprot*

Parámetro que indica el formato de los resultados. En este caso se ajustan al formato de ficha definida por UniProt.

De forma paralela, se utilizó la herramienta antiSMASH (Blin y col., 2017b). Se trata de una plataforma web utilizada para predecir grupos de genes que participan en la síntesis de biocompuestos por parte del microorganismo. El sitio web se localiza en <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start> y necesitó como entrada el archivo *fasta* del ensamblado, posteriormente filtrado.

Por último, se procedió a descargar de la base de datos del NCBI, las secuencias de los genes asociados a los biocompuestos obtenidos en el apartado anterior, para determinar el grado de similitud con los genes predichos en el apartado correspondiente. Para ello, se utilizó la herramienta BLAST+, para, en primer lugar, crear una base de datos específica de los genes específicos, y posteriormente alinearlos con *blastn*:

```
makeblastdb -in genes.fasta -dbtype nucl
```

```
blastn -query nucleotidos.fasta -db genes.fasta -outfmt 6 -evalue 0.0001 -perc_identity 40 -out salida.out
```

Donde:

- *makeblastdb -in genes.fasta -dbtype nucl*
Ejecución para creación de base de datos a través de un archivo *fasta* que aúna las secuencias descargadas de la base de datos, y el formato de la base de datos local a crear, de secuencias nucleotídicas.
- *blastn -query nucleotidos.fasta -db genes.fasta -outfmt 6 -evalue 0.0001 -perc_identity 70 -out salida.out*
Configuración similar a la descrita en el apartado correspondiente al “Filtrado de contigs”, con la novedad de la inclusión de una identidad mínima en la búsqueda de un 40% de similitud.

2.5 CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS PRESENTES EN MUESTRAS NATURALES

2.5.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE MUESTRAS NATURALES

En la presente Tesis doctoral se propuso analizar y comparar los resultados obtenidos a través del procesado del ADN, para así conocer la comunidad absoluta de la muestra, así como del ARN, para determinar la comunidad metabólicamente activa de la misma. De este modo, se conseguía una aproximación de aquellas comunidades microbianas con un papel fundamental en los procesos bioquímicos de los tubos de lava, al igual que nos permitiría identificar grupos latentes o inactivos. Se utilizaron dos metodologías distintas para llevar a cabo la extracción de los ácidos nucleicos. Por una parte, se utilizaron cuatro kits de dos casas comerciales diferentes. De los laboratorios MO BIO (Carlsbad, California, EE.UU.), los PowerBiofilm® DNA Isolation Kit y PowerBiofilm® RNA Isolation Kit, para la extracción del ADN y ARN, respectivamente. De los laboratorios MP Biomedicals (Francia), los ADN FastDNA Spin® Kit for soil y FastRNA® Pro Soil - Direct Kit, para ADN y ARN, respectivamente. En todo momento se siguieron las instrucciones de los fabricantes. Este método se aplicó a aquellas muestras recogidas en abundancia, ya que la cantidad necesaria de muestra debía dividirse por dos para la extracción de ADN y ARN, por separado.

Por otro lado, a aquellas muestras cuya disponibilidad era limitada, se les aplicó la metodología descrita por Griffiths y col. (2000), con ciertas modificaciones. Este método permite obtener el ADN y el ARN en paralelo. A diferencia del método basado en la utilización de kits comerciales, en el aquí descrito fue necesario mantener temperaturas cercanas a los 4 °C para evitar la degradación del ARN presente en las muestras, se utilizó hielo y una centrifuga de refrigeración en todos los pasos. El peso de la muestra no podía superar los 500 mg, ya que una mayor cantidad ofrece un menor rendimiento en la obtención de ácidos nucleicos. A la muestra recogida en tubo de microcentrifuga de 1,5 mL se le añadieron cuentas de vidrio de 3 y 5

mm de diámetro (Merck, Alemania), 500 μ L de tampón CTAB/NaCl y 500 μ L de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1, pH 8.0 \pm 0.2) conservado a 4 °C. Posteriormente, se homogenizó el contenido utilizando un equipo FastPrep 24 (MP Biomedicals, Francia), aplicando un ciclo de 30 segundos a una velocidad de 5,5 m/s. Al término, cada muestra se centrifugó a 12500 rpm durante 5 minutos para seguidamente someter al sobrenadante a una segunda etapa de purificación con 500 μ L de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). La muestra se agitó en vórtex durante breves segundos y se centrifugó de nuevo a 12500 rpm durante 5 min. En el caso de observar un sobrenadante de aspecto turbio, se repitió el proceso.

Tras obtener un sobrenadante limpio, para promover la precipitación de los ácidos nucleicos se añadieron 50 μ L de acetato de sodio 3 M y 500 μ L de isopropanol a -20 °C a cada muestra. Para obtener un mejor resultado, las muestras se mantuvieron a -20 °C durante toda la noche. Al segundo día del proceso, se centrifugaron durante 30 min a 12500 rpm, eliminándose el sobrenadante. A continuación, se añadió 1 mL de etanol 70% a -20 °C para lavar el precipitado. Se dejó secar a temperatura ambiente y se centrifugó de nuevo a 12500 rpm durante 5 min para igualmente descartar el sobrenadante. Para terminar, se eliminaron totalmente los restos de sobrenadante mediante un breve pulso de centrifugación de 10 segundos. Las muestras se dejaron secar al aire hasta que el etanol se evaporó totalmente. Los ácidos nucleicos precipitados se resuspendieron en 50 μ L de agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich, EE.UU.). De estos 50 μ L de ácidos nucleicos totales, 25 μ L fueron conservados a -80 °C para los análisis de ADN, utilizando los restantes 25 μ L para proceder con la extracción del ARN. Antes de iniciar esta etapa, se aplicó al material de trabajo una capa de solución RNA Protect Bacteria Reagent (Quiagen, Alemania), el cual provee inmediata estabilización del ARN previa a la extracción. A continuación, se llevó a cabo una digestión enzimática de las moléculas de ADN presentes en la muestra, utilizando el kit RNase-free DNase Set (Quiagen, Alemania). Para tal efecto, se preparó una mezcla que contenía los 25 μ L de los ácidos nucleicos, a los que se les añadieron 10 μ L de tampón “RDD” salino del propio kit, 2,5 μ L de la enzima ADNasa y 62,5 μ L de agua ultra pura libre de ARNasa. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para favorecer la reacción enzimática. Para el último paso de la purificación del ARN se utilizó el kit RNeasy MinElute Cleanup (Quiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, se usó 14 μL de agua ultra pura libre de ARNs para resuspender el ARN puro, el cual se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su utilización posterior en la síntesis de ADN complementario (ADNc).

Para la retrotranscripción se utilizó el kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, EE.UU.). Previamente se preparó una mezcla en un tubo de PCR de 0,2 mL, donde se añadieron 1 μL de cebador reverso (2 μM) específico (Tabla 2.2 del apartado “Amplificación de los genes ARNr 16S e ITS”), 2 μL de ARN purificado, 0,8 μL de solución de desoxirribonucleótidos (dNTPs, 12,5 mM) y 8,2 μL de agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Cada mezcla fue incubada durante 5 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a continuación se añadieron 4 μL de tampón suministrado por el fabricante y 2 μL de ditiotretitol (DTT) 0.1 M. Se incubó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos. Se añadió 1 μL de la transcriptasa inversa a cada mezcla, terminando el ciclo con una incubación de las muestras a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 50 minutos, seguidos de otros 15 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta fase de incubación de la retrotranscripción se realizó en un termociclador iCycler Thermal Cycler (BioRad, EE.UU.).

La cuantificación y calidad de los ácidos nucleicos extraídos de cada muestra, así como la amplificación de los genes ARNr 16S, para bacterias y arqueas, así como de las regiones ITS, y posterior purificación, fueron acometidos siguiendo los mismos procedimientos descritos en el apartado “Análisis de la concentración del ADN”.

Además, se utilizaron cebadores específicos para la identificación de arqueas. Concretamente, estos cebadores fueron Arch109F y Arch915R. La configuración introducida en el termociclador para la amplificación por PCR comenzó con un primer paso de desnaturalización de la cadena de ADN durante 5 minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de 25 ciclos que comenzaban por una fase de desnaturalización a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, seguida de una reagrupación nucleotídica a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y terminando con una elongación a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto. La última fase de la configuración de amplificación supone un periodo de 10 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5.2 PREPARACIÓN DE GENOTECAS DE ADN Y ARN

2.5.2.1 CLONACIÓN

El estudio de identificación y clasificación de las distintas comunidades microbianas presentes en las muestras naturales se llevó a cabo a través de dos metodologías diferentes. En la primera aproximación, se implementó la técnica de clonación y transformación de la genética celular, cuyo fundamento se basa en introducir el fragmento anteriormente amplificado a través de una molécula exógena de ADN en una célula competente o célula modelo. En el caso de la presente Tesis doctoral, se utilizó un plásmido circular disponible en el kit comercial TOPO-TA® Cloning Kit for sequencing (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. El citado kit provee de todos los elementos necesarios para la realización de la técnica, es decir, el vector de clonación, el plásmido pCR®4-TOPO® (Fig. 2.10), así como las células competentes (*Escherichia coli*) donde se insertará el fragmento a estudiar.

El plásmido pCR™4-TOPO® TA contiene marcadores de resistencia de kanamicina y ampicilina que le confieren resistencia a ampicilina y kanamicina, así como la fusión de genes de *Escherichia coli* ccdB, que se une al extremo del carbono terminal de LacZα. Esta configuración permite la selección positiva de las colonias de *E.coli* con el inserto, ya que la ligación del producto de PCR purificado interrumpe la expresión del lacZα-ccdB (Bernard y Couturier, 1992; Bernard y col., 1994), permitiendo únicamente la viabilidad de recombinantes positivos tras la transformación en medio rico Luria Bertani (LB) con ampicilina a 100 mg/mL.

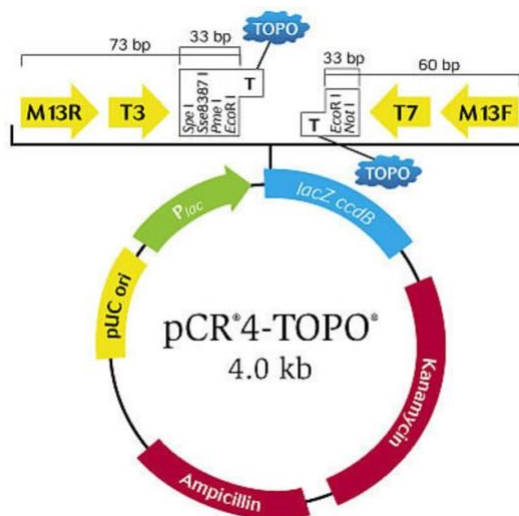


Figura 2.10. Esquema del plásmido pCR4-TOPO.

En primer lugar, se forzó la ligación del producto de PCR al vector de clonación pCR®4-TOPO® a través de enzimas topoisomerasas. Tras un choque de calor a 42 °C para favorecer la permeabilidad de la pared celular se produjo la transformación en células competentes de *Escherichia coli* One Shot Max Efficiency DH5α-T1 competent cells (Invitrogen, EE.UU.).

Para aumentar la eficiencia de transformación máxima de *E.coli*, estas se incubaron en medio SOC, proveído por el fabricante del kit, durante 1 hora a 37 °C en incubación usando un incubador orbital Excella E24 (New Brunswick Scientific - Eppendorf, EE.UU.). Tras este periodo, las células se sembraron en medio de cultivo LB con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Una vez transcurrieron 18-24 horas de incubación en estufa, se seleccionaron al azar entre 100 y 200 colonias o clones por muestra. Estas colonias fueron transferidas a placas de 96 pocillos que contenían medio líquido LB con ampicilina, incubando en agitación toda la noche a 250 rpm y 37 °C. Tras el periodo fijado de incubación, se partió de una fracción de los cultivos de clones para realizar la amplificación por PCR del fragmento de estudio, conservándose la fracción resultante en glicerol al 80% a -80 °C. Para realizar la citada amplificación se añadió 1 µL del cultivo final de LB con ampicilina obtenido del proceso de clonación y transformación, como ADN molde. Se utilizaron los cebadores T7Forward (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') M13Reverse (5'-CAG GAA ACA GCT

ATG AC-3') (Ausubel y col., 1992), específicos de la secuencia del vector, con una configuración de PCR consistente en un ciclo de desnaturalización durante 2 minutos a 95 °C, seguidos de 35 ciclos que comprenden un primer paso de 15 segundos para la desnaturalización a 95 °C, 15 segundos de reagrupación de los nucleótidos a 55 °C y, para terminar cada ciclo, 30 segundos de elongación a 72 °C. La configuración termina con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se verificó la recombinación del inserto en la célula transformante por electroforesis horizontal en gel de agarosa (apartado “Amplificación de los genes ARNr 16S e ITS”).

Análisis de las secuencias de clones: identificación y clasificación de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs)

Los productos de PCR de aquellos clones que presentaron inserto se secuenciaron en la empresa Macrogen Europe Sequencing Services (Amsterdam, Países Bajos), utilizando el cebador directo correspondiente al fragmento de ADN estudiado: 616F, ITS1F y Arch109F. Las secuencias fueron preprocesadas manualmente por grupos, diferenciando por los cebadores de amplificación/secuenciación, para valorar su calidad a través de sus cromatogramas y eliminar ruido de cada secuencia a través de BioEdit Sequence Alignment versión 7.0.5.3 (Hall, 1999). El preprocesado finalizó con la eliminación de los cebadores y de aquellas secuencias cortas o con baja calidad (Fig. 2.11).

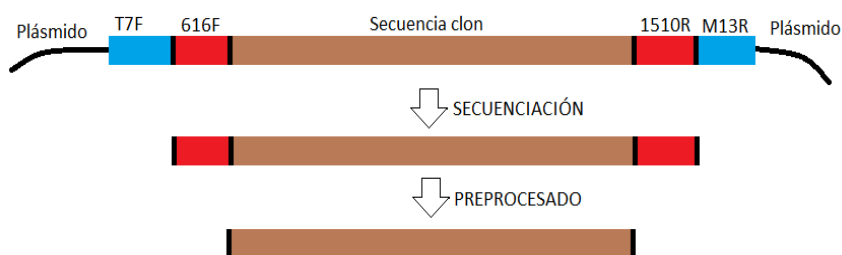


Figura 2.11. Fases de secuenciación y preprocesado del fragmento insertado en el plásmido.

La segunda parte del análisis comenzó después del preprocesado, con el objetivo de generar grupos filogenéticos y su posterior clasificación taxonómica. Para llevar a cabo esta primera parte de agrupación se utilizó el programa Mothur (Schloss y col., 2009). Con este software se comprobó la existencia de quimeras, que son elementos fallidos durante la PCR que dan lugar a secuencias que aúnan fragmentos de ADN de al menos dos microorganismos diferentes de procedencia, y su consiguiente eliminación del conjunto de datos para no afectar en el correcto resultado del análisis. Una vez se eliminaron las quimeras, se procedió a la construcción de las matrices de distancia de las secuencias por similitud y la asignación de las mismas a las Unidades Taxonómicas Operacionales u OTUs (Operational Taxonomic Units). Para tal efecto, se usó un umbral de corte del 97% de similitud de secuencia como criterio para la generación de estos OTUs.

Para determinar la clasificación taxonómica de cada OTU, se analizó la similitud presentada entre la secuencia del clon representativo y las existentes en la base de datos del GenBank, empleando el algoritmo BLASTn (Altschul y col., 1990) incluido en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, EE.UU.) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en la base de datos EzBioCloud (Yoon y col., 2017). En la identificación de cada secuencia siempre se intentó concretar el máximo nivel taxonómico posible.

Las secuencias representativas de los OTUs de cada genoteca creada a partir de cada muestra estudiada, se depositaron en la base de datos nucleotídica GenBank. Para ello se utilizó la aplicación del European Nucleotide Archive (ENA) incluida en el European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/ena>).

2.5.2.2 *METAGENÓMICA FILOGENÉTICA*

Para estudiar taxonómicamente aquellas comunidades presentes en las muestras naturales se utilizaron técnicas de metagenómica filogenética basadas en la secuenciación masiva (NGS). Para el análisis de las muestras se utilizó la plataforma Illumina MiSeq, para obtener librerías de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S, para bacterias y arqueas a través de lecturas cortas pareadas ("Paired-end") de 250 y 300 pares de bases (Fig. 2.5). Mientras que

con la técnica de clonación se consigue la secuencia completa del gen ARNr 16S, con la secuenciación masiva utilizando la plataforma de Illumina, las secuencias nunca superan los 469 pares de bases. Las regiones V3 y V4 proveen amplia información para la clasificación taxonómica de las comunidades bacterianas y de arqueas (Takahashi, 2014). La secuenciación “Paired-end” permite la amplificación del fragmento de ADN por cada extremo, obteniendo las *reads* que posteriormente se ensamblan dando lugar a secuencias finales para su estudio taxonómico.

La extracción de ADN de las muestras naturales para su secuenciación por NGS se llevó a cabo siguiendo los mismos métodos descritos anteriormente. Una vez extraído el ADN, se purificó y concentró usando el kit comercial Genomic DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research Corp.; Irvine, California, EE.UU.). El servicio de amplificación y secuenciación del fragmento de interés, fue acometido por Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y Stab Vida (Lisboa, Portugal). Las concentraciones mínimas de ADN exigidas por las compañías de secuenciación masiva variaron entre 100-200 ng totales, para el caso de Stab Vida, y 5 ng/ μ L con un volumen total de 30 μ L, en el caso de Macrogen. La medición de la concentración del ADN se realizó utilizando el fluorímetro Qubit® 2.0 de Invitrogen (Life Technologies, Singapur), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El servicio de secuenciación proveyó las *reads* o datos crudos sin adaptadores y códigos de barras o “barcodes”, es decir, las lecturas de cada muestra fueron demultiplexadas en origen. La demultiplexación se basa en la identificación de cada lectura a la muestra de la cual provenía el ADN, ya que, previamente, a cada fragmento de ADN se le insertaba el código de barras que permite asignar cada lectura a su muestra (multiplexación), de esta manera se pueden secuenciar múltiples muestras durante el proceso de secuenciación (Fig. 2.12). Las lecturas demultiplexadas se agrupan en un fichero *fastq* para cada muestra. Tras el pre-procesado de las lecturas por parte de la empresa de secuenciación, se procedió al procesado. Éste se llevó a cabo haciendo uso del servicio del clúster de supercomputación del CICA. Para la realización de los análisis taxonómicos y los cálculos de los índices de diversidad se utilizaron tanto los “Trabajos simples” como los “Trabajos paralelos multiprocesador”.

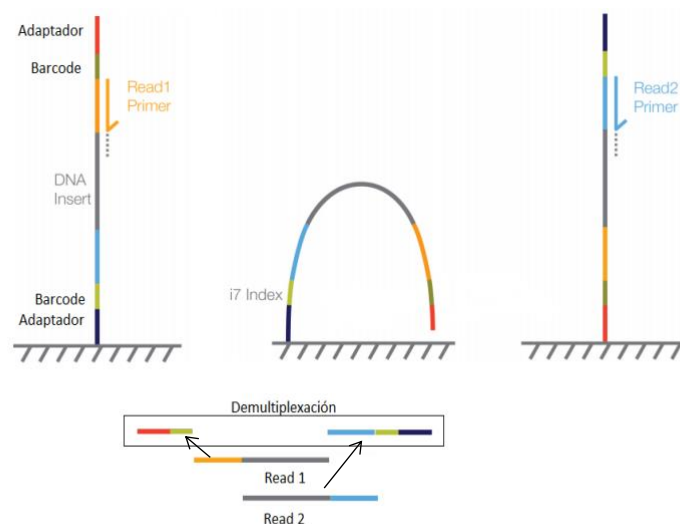


Figura 2.12. Multiplexado durante secuenciación del ADN en plataforma Illumina y posterior de-multiplexación. Imagen adaptada de Illumina.

Análisis de calidad y trimming de las lecturas crudas

En primer lugar, se realizó un análisis de calidad y *trimming* o recorte en base a la calidad, si es necesario, de las lecturas o datos crudos. Para tal efecto se utilizó las aplicaciones FASTQC (Andrews, 2010) y Trimmomatic (Bolger y col., 2014), respectivamente. FASTQC realiza un informe de las lecturas derivadas de la secuenciación en formato FASTQ. Este es un formato estándar, basado en texto, para el almacenamiento de secuencias. Contiene información sobre la calidad y la misma secuencia de cada lectura. La línea de cabecera o “Header” comienza por el símbolo “@”, a diferencia de los ficheros FASTA, cuya línea de cabecera comienza por el símbolo “>”. Seguidamente a la línea correspondiente a la secuencia nucleotídica, le sigue una línea de caracteres ASCII que indican la calidad de cada nucleótido, determinada por el índice de Phred. Un valor de calidad de Phred es una medida que refleja la calidad de los nucleótidos que fue originada dentro del contexto del Proyecto Genoma Humano. La probabilidad de error P_e (probabilidad de que el nucleótido secuenciado sea incorrecto) está relacionado con un valor de calidad Phred, Q_{PHRED} , como se aprecia en la siguiente ecuación:

$$P_e = 10^{\frac{Q}{10}}$$

O también:

$$Q_{\text{PHRED}} = -10 \log_{10} P_e$$

Así pues, cuanto menor sea la probabilidad de tener un nucleótido incorrecto, mayor será la calidad de este en base Phred (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Índices de calidad Phred.

P_e	Q_{PHRED}	Confiabilidad en el nucleótido
1/10	10	90%
1/100	20	99%
1/1000	30	99,9%
1/10000	40	99,99%
1/100000	50	99,999%

La secuenciación NGS basada en la plataforma Illumina, utilizada en la presente Tesis doctoral y llevada a cabo en las empresas de secuenciación anteriormente nombradas, utiliza el método de codificación ASCII denominado Phred+33, donde los valores de calidad están en un rango de entre 0 y 42 (Fig. 2.13).

Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII	Q	P_error	ASCII
0	1.00000	33 !	11	0.07943	44 ,	22	0.00631	55 7	33	0.00050	66 B
1	0.79433	34 "	12	0.06310	45 -	23	0.00501	56 8	34	0.00040	67 C
2	0.63096	35 #	13	0.05012	46 .	24	0.00398	57 9	35	0.00032	68 D
3	0.50119	36 \$	14	0.03981	47 /	25	0.00316	58 :	36	0.00025	69 E
4	0.39811	37 %	15	0.03162	48 0	26	0.00251	59 ;	37	0.00020	70 F
5	0.31623	38 &	16	0.02512	49 1	27	0.00200	60 <	38	0.00016	71 G
6	0.25119	39 '	17	0.01995	50 2	28	0.00158	61 =	39	0.00013	72 H
7	0.19953	40 (18	0.01585	51 3	29	0.00126	62 >	40	0.00010	73 I
8	0.15849	41)	19	0.01259	52 4	30	0.00100	63 ?	41	0.00008	74 J
9	0.12589	42 *	20	0.01000	53 5	31	0.00079	64 @	42	0.00006	75 K
10	0.10000	43 +	21	0.00794	54 6	32	0.00063	65 A			

Figura 2.13. Código ASCII para interpretación de calidad en los nucleótidos. Tabla tomada del sitio web de usearch (https://www.drive5.com/usearch/manual/quality_score.html).

Análisis de calidad de las lecturas: FASTQC

Se procedió a la ejecución de FASTQC lanzando los siguientes comandos:

```
fastqc -o directorio_outputF lecturaF.fastq
```

```
fastqc -o directorio_outputR lecturaR.fastq
```

Donde:

- *fastqc*
Comando principal de la herramienta de análisis de calidad
- *-o directorio_outputF*
Nombre y localización del directorio que FASTQC crea con los resultados de la ejecución del comando. En este caso se analizan las lecturas *forward*, en el caso de *directorio_outputR*, las lecturas *reverse*
- *lecturaF.fastq*
Nombre del archivo fastq que contiene las lecturas, en este caso, *forward*.

Filtrado de lecturas: Trimmomatic

El informe de FASTQC permitió definir unas conclusiones para proceder al *trimming* de las lecturas con Trimmomatic. La ejecución del software siguió el siguiente patrón:

```
java -jar trimmomatic-0.36.jar PE -phred33 reads_F reads_R  
outputF_paired.fastq outputF_unpaired.fastq outputR_paired.fastq  
outputR_unpaired.fastq options
```

Donde:

- *java*
Intérprete de entorno JAVA necesario para la ejecución del software
- *-jar*
Opción que indica a JAVA que se va a ejecutar un archivo .jar
- *trimmomatic-0.36.jar*
Software de *trimming* escrito en lenguaje java
- *PE -phred33*

Orden que indica que las lecturas a tratar son PairedEnd (reads_F, reads_R)

- *outputF_paired.fastq, outputR_paired.fastq*

Representa la salida de las lecturas tratadas pareadas

- *outputF_unpaired.fastq, outputR_unpaired.fastq*

Representa aquellas *reads* cuyo par no ha sido secuenciado

- *options*

Parámetros que la herramienta ejecutará para realizar el tratamiento sobre las lecturas. Todos los parámetros se pueden encontrar en el sitio web de la herramienta. A continuación, se describen los utilizados en la presente tesis doctoral:

- ILLUMINACLIP: elimina de las lecturas aquellos adaptadores y otras secuencias incluidas durante el proceso de secuenciación de Illumina.
- SLIDINGWINDOW: Desde el extremo 5' de la lectura se define un marco de *trimming* que recorre la secuencia y comienza a recortar nucleótidos una vez su calidad desciende por debajo del umbral fijado.
- LEADING: Elimina nucleótidos de la secuencia desde el principio de ésta, según el umbral de calidad fijado.
- TRAILING: Elimina nucleótidos de la secuencia desde el final de ésta, según el umbral de calidad fijado.
- CROP: Elimina nucleótidos desde el final de la lectura según el número de estos que se deseen eliminar, sin atender a la calidad.
- HEADCROP: Elimina nucleótidos desde el principio de la lectura según el número de estos que se deseen eliminar, sin atender a la calidad.
- MINLEN: Se elimina la lectura si su longitud está por debajo del umbral fijado.

Ensamblado de lecturas

Las lecturas pareadas *forward* y *reverse* fueron ensambladas utilizando el programa PEAR (Zhang y col., 2014). La ejecución de la herramienta se describe a continuación:

```
pear -f lecturasF.fastq -r lecturasR.fastq -o pear_output -j 5
```

Donde:

- *pear*
Comando de ejecución de PEAR
- *-f lecturasF.fastq -r lecturasR.fastq*
Ficheros *forward* y *reverse* de las lecturas a ensamblar
- *-o pear_output*
Directorio de salida de los resultados tras ejecución del ensamblador
- *-j 5*
Este parámetro permite la ejecución multiprocesos de la orden. Es decir, el trabajo de ensamblado se repartirá en 5 procesadores para agilizar el proceso y repartir su carga.

Análisis taxonómico y estadístico de las secuencias: QIIME

Una vez se ensamblaron las lecturas de cada muestra, se procedió al análisis de la comunidad microbiana a través de las secuencias resultantes. Para tal efecto se implementó QIIME (Kuczynski y col., 2011), acrónimo en inglés de Percepciones Cuantitativas en Ecología Microbiana (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). QIIME es una suite creada en Python que consiste en una cadena de procesos conectados de forma tal que la salida de cada comando es el inicio del siguiente, aunque estos comandos se pueden lanzar de forma independiente también. Es lo que se conoce técnicamente como tubería o pipeline. Los trabajos realizados en la presente Tesis doctoral se han basado en la versión QIIME 1.9.1.

Puesto que las secuencias están ya demultiplexadas, en primer lugar, se concentran todas las secuencias diferenciadas por la muestra a la que pertenecen en un único fichero. Para ello se ejecutó la siguiente orden soportada por la versión 1.9.1:

```
multiple_split_libraries_fastq.py -i directorio_secuencias -o directorio_output
```

Donde:

- *multiple_split_libraries_fastq.py*
Es el comando que aúna las secuencias de diferentes archivos fastq en un fichero formato fasta denominado *seqs.fna*.

- *-i directorio_secuencias*
Directorio donde se encuentran las secuencias por muestras. El comando creará un *header* con el nombre de cada muestra por cada secuencia perteneciente a dicha muestra.
- *-o directorio_output*
Directorio o localización donde se creará el archivo seqs.fna.

Antes de continuar con esta metodología, se procedió a eliminar los cebadores de las secuencias y un posterior filtrado de quimeras. Los cebadores de Illumina utilizados para el estudio de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S fueron el 314F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Estos cebadores se localizaron al principio y final de las secuencias, por lo que se decidió cortar sus extremos de acuerdo a la longitud de la secuencia de los cebadores. Para llevar a cabo dicha acción se creó un archivo basado en PERL:

```
#!/usr/bin/perl
use strict;
use warnings;

use Getopt::Long;
use Bio::SeqIO;
my $help;
my $file;
my $prime_3;
my $prime_5;

GetOptions(
    "help" => \$help,
    "file|f=s" => \$file,
    "3_prime|t=i" => \$prime_3,
    "5_prime|f=i" => \$prime_5
);

if($file and $prime_5>0 and $prime_3>0){
    my $seqio = Bio::SeqIO->new(-format=>"fasta", -file=>$file);
    my %hash_original;
    my %hash_final;
    open(FASTA,">new_fasta.fa") || die "Cant create new_fasta.fa\n";
    while(my $seq = $seqio->next_seq) {
        my $id=$seq->display_id();
        my $sequence=$seq->seq;
        $hash_original{$id}=length($sequence);
        $sequence=~s/^\\w{1,$prime_5}\\//g;
        $sequence=~s/\\w{1,$prime_3}\\//g;
        $hash_final{$id}=length($sequence);
        print FASTA ">$id\\n$sequence\\n";
    }
    close FASTA;
}
```

```

}
else{
  my $usage = qq{
    $0
    Getting help:
    [--help]
    Needed parameters:
    [file|fi] : Fasta file to read from
    [5_prime|t] : Number of nucleotides to remove from 3' (>0)
    [3_prime|f] : Number of nucleotides to remove from 5' (>0)
    Examples:
    Process file sequences.fa and remove 3 nt from 3' and 4 from 5'
    $0 -file sequences.fa -3_prime 3 -f 4
  };
  print STDERR $usage;
  exit();
}

```

Una vez se eliminaron los cebadores de las secuencias se ejecutó un comando propio de QIIME que utiliza un software externo para la identificación de quimeras: USEARCH (Edgar, 2010). La versión gratuita de esta herramienta, de 32 bits, no acepta ficheros de datos de mucho tamaño, por lo que se procedió a fraccionar el fichero *seqs.fna* en secciones de 250 MB. Este paso se implementó utilizando el comando Linux *split* con la opción *--bytes=250MB*, para fijar fracciones máximas de 250 mega bytes. Para cada fracción generada, se ejecutó la siguiente orden:

```

identify_chimeric_seqs.py -i Canarias_aa -m usearch61 -o
usearch_checked_chimeras_ac/ -r
SILVA_128_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/97/97_otus_16S.fasta --
threads 8

```

Donde:

- *identify_chimeric_seqs.py*
Comando de QIIME para identificación de quimeras.
- *-i Canarias_aa*
Fracción generada tras ejecución del comando *Split*.
- *-m usearch61*
Módulo *usearch* utilizado para la búsqueda de quimeras.
- *-o usearch_checked_chimeras_ac/*
Directorio donde se ubican los archivos con las secuencias quiméricas y no quiméricas.

Una vez se agruparon en un único fichero todas las secuencias, sin quimeras y diferenciadas por la muestra de la que procedían, se procedió a lanzar la pipeline que proporcionaría los resultados de abundancia y taxonomía de cada muestra. En concreto se ejecutó el siguiente comando que, de forma secuencial, concatena los resultados que van obteniéndose de la ejecución de subcomandos asociados:

```
pick_open_reference_otus.py -i seqsChim.fna -o qiime_output/ -r SILVA_128_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/99/99_otus_16S.fasta -p param.txt
```

Donde:

- *pick_open_reference_otus.py*
Comando de ejecución principal que concatena las salidas de subcomandos en seis pasos, cuatro de generación de OTUs y dos de creación de tablas y árboles de OTUs:
 - Paso 1: Generación de OTUs con respecto a base de datos de referencia:
(*SILVA_128_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/99/99_otus_16S.fasta*).
 - Paso 2: Aquellas secuencias “huérfanas” que no han podido agruparse en OTUs haciendo uso de la base de datos de referencia, serán utilizadas para generar OTUs “de novo”. Dichas secuencias “huérfanas” son las secuencias de referencia para el siguiente paso
 - Paso 3: Generación de OTUs “de novo” utilizando para tal efecto la referencia generada en el paso anterior.
 - Paso 4: Configura un último paso de generación de OTUs “de novo” para aquellas secuencias que todavía no se han agrupado. Se determina la secuencia representativa de cada grupo o clúster.
 - Paso 5: Creación del mapa de OTUs.
 - Paso 6: Creación de tablas y árboles de OTUs a través del mapa creado en el paso anterior. Se generan metadatos en formato BIOM (Biological Observation Matrix).
- *-i seqsChim.fna*
Fichero que aúna las secuencias de las muestras estudiadas proveniente del comando anterior.

- *-o qiime_output/*
Directorio de salida de resultados originados por la ejecución de este comando.
- *-r SILVA_128_QIIME_release/rep_set/rep_set_16S_only/99/99_otus_16S.fasta*
Base de datos específica para bacterias y arqueas con un umbral de similitud del 99%.
- *-p param.txt*
Fichero de texto plano con configuración específica:
`assign_taxonomy:id_to_taxonomy_fp SILVA_128_QIIME_release/./consensus_taxonomy_7_levels.txt` →
apunta al archivo con la definición taxonómica de las secuencias en base de datos de referencia y sus números de acceso.
`assign_taxonomy:reference_seqs_fp SILVA_128_QIIME_release/./99_otus_16S.fasta`
→ secuencias fasta de la base de datos de referencia.
`assign_taxonomy:similarity 0.8` → umbral de similitud fijado para clasificar las secuencias problemas a través de la base de datos de referencia (0.8, sería 80% de similitud).

A continuación, se procedió a la conversión del formato BIOM a fichero de texto plano, así como a la generación de ficheros de texto plano para la abundancia de las divisiones taxonómicas y la generación de gráficos de abundancia relativa. La ejecución de los siguientes comandos se llevó a cabo de forma atendida, ya que, a diferencia del comando anterior, cada uno de los tres procesos descritos no necesita la salida de cualquiera de ellos para su ejecución:

- Conversión de metadatos BIOM a texto plano:
biom convert -i otu_table_mc2_w_tax.biom -o otu_table_mc2_w_tax.txt --to-tsv --header-key taxonomy

Donde:

- *biom convert*
Comando externo, necesita su instalación como dependencia de QIIME.
- *-i otu_table_mc2_w_tax.biom*
Metadato generado en pasos anteriores.
- *-o otu_table_mc2_w_tax.txt*
Salida en fichero de texto plano.
- *--to-tsv --header-key taxonomy*

Parámetros de ejecución para que el fichero generado en la opción *-o* esté separado por tabulador e incluya la información taxonómica.

- Resúmenes de los distintos niveles taxonómicos:
summarize_taxa.py --level=1,2,3,4,5,6,7 -i otu_table_mc2_w_tax.biom -o taxonomy_summaries/

Donde:

- *summarize_taxa.py*
Comando de QIIME.
- *--level=1,2,3,4,5,6,7*
Niveles taxonómicos generados. Desde Reino (1), hasta especie (7).
- *-i otu_table_mc2_w_tax.biom*
Metadato anteriormente generado.
- *taxonomy_summaries/*
Directorio que contiene el resumen taxonómico por niveles.

- Generación de gráficos:
summarize_taxa_through_plots.py -o taxa_summary -i otu_table_mc2_w_tax.biom

Donde:

- *summarize_taxa_through_plots.py*
Fichero de QIIME.
- *-o taxa_summary/*
Directorio a generar con los gráficos de abundancia.
- *-i otu_table_mc2_w_tax.biom*
Metadato generado anteriormente.

Análisis estadísticos

Se realizaron estudios basados en la diversidad alfa y beta. Los cálculos de los índices de diversidad alfa van orientados al estudio de la riqueza de los diferentes filotipos presentes en un determinado nicho ecológico. Los índices de diversidad utilizados para el estudio de las muestras fueron Simpson y Shannon, así como los estimadores de riqueza

ACE y Chao1. Los valores del índice de Simpson (1949) se encuentran entre 0 y 1: conforme más bajo sea el valor, menos diversidad habrá en la muestra, y al contrario, a valor más cercano a 1, mayor diversidad total en la muestra. Por el contrario, Shannon (1949) ofrece una visión sobre la distribución de uniformidad de los filotipos y el número de individuos dentro de la muestra. El valor de Shannon (H) es igual a 0 si la muestra contiene sólo una especie. Valores superiores a 0 pueden ser interpretados por el número efectivo de especies (ENS) que estima el número de especies presentes en la muestra mediante la función exponencial $e^{(H)}$. El índice ACE realiza una estimación del número de especies basado en el número de OTUs en la muestra teniendo en cuenta grupos abundantes y raros, considerando “abundantes” a aquellos que contienen más de 10 individuos y “raros” a aquellos con menos de 10 (Chao y Lee, 1992; Chao y col., 2000). Chao1 también realiza una estimación de especies en la muestra, en este caso, dando más valor a los OTUs con baja abundancia, con 2 secuencias por grupo (Chao, 1984).

Los índices de diversidad beta tienen como objetivo buscar la diferencia de composición de las comunidades presentes en las muestras. Es decir, cual homogénea o heterogénea es la comunidad de microorganismos estudiada en una muestra con respecto al resto de muestras analizadas. La técnica utilizada fue el Análisis de Coordenadas Principales o PCoA, de su acrónimo en inglés, y se basa en el diseño de matrices de distancias (Gower, 1966). En este estudio se ha utilizado la métrica “Unifrac” con las variantes “Weighted” y “Unweighted” (Lozupone y Knight, 2005; Lozupone y col., 2007).

El cálculo de estos índices se llevó a cabo a través de QIIME siguiendo la siguiente configuración:

- Diversidad Alfa:
alpha_rarefaction.py -i otu_table_mc2_w_tax.biom -o alpha -m file_mapp.txt -t rep_set.tre -p alpha_pars.txt

Donde:

- *alpha_rarefaction.py*

Es el comando principal de este proceso que concatena, a modo de tubería, la ejecución de cuatro subcomandos para la generación de las métricas de diversidad y gráficos de rarefacción.

- *-i otu_table_mc2_w_tax.biom*
Tabla de OTUs generada anteriormente.
- *-o alpha*
Directorio de salida de resultados generados.
- *-m file_mapp.txt*
Fichero separado por tabulaciones (tsv) obligatorio para la ejecución del comando principal. Contiene información adicional sobre las muestras necesarias para el análisis:

#SampleID	BarcodeSequence	LinkerPrimerSequence	Description
MZ032B.fastq		MZ03_2B	
MZ033C.fastq		MZ03_3C	
MZ037G.fastq		MZ03_7G	
MZ038H.fastq		MZ03_8H	
MZ039I.fastq		MZ03_9I	
MZ0310J.fastq		MZ03_10J	
MZ2611K.fastq		MZ26_11K	
MZ2612L.fastq		MZ26_12L	
EP016F.fastq		EP01_6F	

- *-t rep_set.tre*
Árbol filogenético generado anteriormente.
- *-p alpha_pars.txt*
Archivo de configuración de las métricas de diversidad alfa:

```
alpha_diversity:metrics shannon,simpson,ace,chao1
```

- Diversidad Beta:

beta_diversity_through_plots.py -i otu_table_mc2_w_tax.biom -o beta/ -t rep_set.tre -m file_mapp.txt

Donde:

- *beta_diversity_through_plots.py*
Comando principal que desencadena la ejecución de subcomandos cuyo objetivo es desarrollar el análisis de la diversidad beta a través del PCoA, y la generación de gráficos.
- *-i otu_table_mc2_w_tax.biom*
Tabla de OTUs generada anteriormente.
- *-o beta/*
Directorio de salida de resultados generados.
- *-t rep_set.tre*
Árbol filogenético creado anteriormente.
- *-m file_mapp.txt*
Mismo archivo descrito en el apartado de diversidad alfa.

2.6 MEDIOS DE CULTIVO

Agar *Corynebacterium*

Peptona de caseína	10,0 g
Extracto de levadura (BD)	5,0 g
Glucosa (Agros Organics)	5,0 g
NaCl (Merck)	5,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Agar levadura-almidón

Extracto de Levadura (Difco)	2,0 g
Almidón soluble	10,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Agar Nutritivo (NA)

Agar nutritivo (Difco)	23,0 g
Agar	7,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Agar Nutritivo con almidón (NSA)

Agar nutritivo (Difco)	23,0 g
Almidón (VWR)	10,0 g
Agar	7,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Agar Nutritivo con magnesio y glicerol (NA-Mg-G)

Caldo nutritivo (Difco)	8,0 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	30,0 g
Glicerol	20,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La preparación del medio líquido no incluye agar (NB-Mg-G).	

API AUX (BioMérieux, France)

Sulfato amónico	2,0 g
Agar	1,5 g
Solución de vitaminas	10,5 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Fosfato monosódico	6,24 g
Cloruro potásico	1,5 g
Agua destilada	1.000 mL
pH 7,0-7,2.	

Diclorán-Rosa de Bengala-Cloranfenicol-Agar (DRBCA)

DRBC (Merck)	31,6 g
Agar	5,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Calentar para disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Extracto de Malta-Agar (MEA)

Extracto de malta (BD)	20,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Ajustar el pH a 8,0. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Medio halófilo modificado (HM)

Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	20,0 g
K ₂ SO ₄ (AppliChem)	5,0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Panreac)	0,1 g
Extracto de levadura (BD)	5,0 g
NaCl (Merck)	70,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Ajustar el pH a 8,0. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Medio *International Streptomyces Project 2* (ISP2)

Extracto de levadura (BD)	5,0 g
Extracto de malta (BD)	10,0 g
Dextrosa (Agros Organics)	4,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Medio *International Streptomyces Project 3* (ISP3)

Harina de avena	20,0 g
Agar	18,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Solución de sales:	1 mL
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 mL

Ajustar el pH a 7,2. Calentar la harina en el agua destilada y filtrar. Añadir el agar. Y la solución de sales. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio *International Streptomyces Project 4* (ISP4)

Solución 1:

Almidón (VWR)	10,0 g
Agua destilada	500 mL

Solución 2:

CaCO ₃ (Agros Organics)	2,0 g
K ₂ PO ₄ (AppliChem)	1,0 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	1,0 g
NaCl (Merck)	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Agros Organics)	2,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Solución de sales (ISP3)	1 mL

Ajustar el pH a 7,2. Mezclar ambas soluciones. Añadir 20,0 g de agar. Y la solución de sales. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio *International Streptomyces Project 5* (ISP5)

L-asparagina	1,0 g
Glicerol	10,0 g
K ₂ PO ₄ (AppliChem)	1,0 g
Agar	20,0 g
Solución de sales (ISP3)	1 mL
Agua destilada	1.000 mL

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Medio *International Streptomyces Project 6* (ISP6)

Peptona	15,0 g
Proteosa peptona	5,0 g
Citrato de amonio férrico	0,5 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Tiosulfato de sodio	0,08 g

Extracto de levadura (BD)	1,0 g
Agar	20,0 g
Solución de sales (ISP3)	1 mL
Agua destilada	1.000 mL
Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Medio *International Streptomyces Project 7* (ISP7)

L-asparagina	1,0 g
L-tirosina	0,5 g
Glicerol	15,0 g
K ₂ PO ₄ (AppliChem)	0,5 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	0,5 g
NaCl (Merck)	0,5 g
Fe SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	10,0 mg
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Solución de sales:	1 mL
H ₃ BO ₃	2,85 g
Fe SO ₄	1,36 g
Tartrato de sodio	1,77 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,8 g
ZnCl ₂	20,8 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	26,9 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	40,4 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25,2 mg
Agua destilada	100 mL
Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Medio mínimo + Fuente de carbono simple

Na ₂ HPO ₄ (AppliChem)	6,0 g
K ₂ PO ₄ (AppliChem)	5,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g
NaCl (Merck)	0,5 g

Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	1 mL (1M)
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Panreac)	1 mL (0,1M)

Fuente de carbono simple	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Las fuentes de carbono simple fueron: Manosa, D-galactosa, xilosa, fructosa, Myo-inositol, sacarosa, maltosa, lactosa, dextrano, glicerol, glucosa y manitol.

Medio *Streptomyces* (GYM)

Glucosa (Agros Organics)	4,0 g
Extracto de levadura (BD)	4,0 g
Extracto de malta (BD)	10,0 g
CaCO ₃ (Agros Organics)	2,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Luria Bertani (LB)

Tryptona (BD)	10,0 g
Extracto de levadura (BD)	5,0 g
NaCl (Merck)	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL

Ajustar el pH a 8,0. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La preparación del medio líquido no incluye agar.

LB con ampicilina

Preparar el medio de cultivo y esterilizar tal como se indicó anteriormente. Enfriar hasta 50 °C. Añadir 1 mL de solución de ampicilina a concentración de 100 mg/mL.

Rouf modificado (Rouf y Stokes, 1964) (Rx)

Peptona (BD)	0,50 g
Citrato ferroamónico	0,15 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	0,10 g
Cl ₂ Ca (2H ₂ O)	0,05 g
SO ₄ Mn · H ₂ O (AppliChem)	0,20 g
Cl ₃ Fe · 6H ₂ O	0,01 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Ajustar el pH a 6,4. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Tryptona de Soja-Agar (TSA)

Caldo triptona-soja (BD)	30,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La preparación del medio líquido no incluye agar (TSB).	

Tryptona de Soja-Agar con glicerol (TSA-G)

Caldo triptona-soja (BD)	30,0 g
Glicerol	20,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Tryptona de Soja-Agar con sodio y magnesio (TSA-Na-Mg)

Caldo triptona-soja (BD)	30,0 g
NaCl (Merck)	30,0 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	20,0 g
Agar	20,0 g

Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Tryptona de Soja-Agar con sodio, magnesio y glicerol (TSA-Na-Mg-G)

Caldo triptona-soja (BD)	30,0 g
NaCl (Merck)	30,0 g
Mg SO ₄ · 7H ₂ O (AppliChem)	20,0 g
Glicerol	20,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1.000 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

2.7 REACTIVOS

Reactivo 1 MIDI

Hidróxido de sodio (NaOH)	15,0 g
Agua destilada	50 mL
Metanol	50 mL

Reactivo 2 MIDI

Ácido clorídrico (HCl) 6N	50 mL
Metanol	50 mL

Reactivo 3 MIDI

Metil-tert-butil éter (MTBE)	50 mL
Hexano	50 mL
Añadir el MTBE al Hexano.	

Reactivo 4 MIDI

Hidróxido de sodio (NaOH)	6,0 g
Agua destilada	500 mL

Reactivo James (BioMérieux)

Componente J2183 (confidencial)	0,66 g
Ácido clorhídrico (HCl) 1N	100 mL

Reactivo NIT 1 (BioMérieux)

Ácido sulfamílico	0,4 g
Ácido acético	30,0 g
Agua destilada	70,0 mL

Reactivo NIT 2 (BioMérieux)

N,N-dimetil-1-naftilamina	0,6 g
Ácido acético	30,0 g
Agua destilada	70 mL

2.8 SOLUCIONES Y TAMPONES

Solución de acetato de sodio 3M (pH 7)

Acetato de sodio trihidratado 40,81 g
Disolver el acetato de sodio trihidratado en 200 mL de agua desmineralizada y ajustar el pH a 7 empleando ácido acético glacial. Añadir agua desmineralizada hasta un volumen final de 250 mL. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 10%

Disolver 1 g de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich) en 10 mL de agua destilada libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich). Conservar a -20 °C.

Solución CTAB/NaCl

NaCl	4,10 g
Bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (CTAB)	10,0 g

Añadir el NaCl a 80 mL de agua desmineralizada. Añadir lentamente el CTAB mientras se agita. Si fuese necesario, calentar a 65 °C para disolver y ajustar hasta un volumen final de 100 mL.

Solución de EDTA 0.5M (pH 8.0)

EDTA	186,1 g
------	---------

Disolver el EDTA en 800 mL de agua desmineralizada y ajustar el pH a 8.0 empleando NaOH. Añadir agua desmineralizada hasta un volumen final de 1.000 mL. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución de hidróxido de sodio 1M

Disolver 40 g de NaOH en 1.000 mL de agua destilada.

Solución de lisozima

Disolver 300 mg de lisozima en 1 ml de tampón TE 1x (pH 7.5). Mantener la solución a -20 °C.

Solución de NaCl 5M

NaCl 292,2 g

Disolver el NaCl en 800 mL de agua desmineralizada y ajustar el volumen a 1.000 mL. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Solución de NaCl al 0.85% (p/v)

NaCl (Merck) 8,5 g

Disolver en 1000 ml de agua desmineralizada.

Solución de proteinasa K

Disolver 20 mg de proteinasa K en 1 ml de tampón TE 1x (pH 7.5). Incubar a 37 °C durante 1 hora. Mantener la solución a -20 °C.

Solución SDS al 10% (p/v)

Dodecacilsulfato de sodio (SDS) 10,0 g

Agua desmineralizada 90 mL

Añadir el SDS al agua y calentar a 68 °C para disolver. Ajustar a pH 7.2 empleando HCl concentrado y añadir agua desmineralizada hasta 100 mL.

Solución SDS al 25% (p/v)

Dodecacilsulfato de sodio (SDS) 25,0 g

Agua desmineralizada 90 mL

Añadir el SDS al agua y calentar a 68 °C para disolver. Ajustar a pH 7.2 empleando HCl concentrado y añadir agua desmineralizada hasta 100 mL.

Tampón EB

Tris-HCl (pH 8.0)	1 mL (10 mM)
Agua desmineralizada	99,0 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.	

Tampón TE 1x (pH 8.0 o pH 7.5)

Tris-HCl (pH 8.0 o pH 7.5)	1 mL (1M)
EDTA (pH 8.0)	0,20 mL (0,5M)
Agua desmineralizada	98,8 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.	

Tampón TNE 1x

Tris-HCl (pH 8.0)	1 mL (1M)
NaCl	2 mL (5M)
EDTA (pH 8.0)	0,20 mL (0,5M)
Agua desmineralizada	96,8 mL
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.	

Tampón TAE 50x

Base Tris	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA	37,2 g
Ajustar el volumen a 1000 mL de agua desmineralizada. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.	

Tampón TAE 0.5x

Añadir 10 ml de TAE 50x a 990 mL de agua desmineralizada.

Solución Tris-HCl 1M (pH 8.0 o 7.5)

Base Tris 121 g

Disolver la base tris en 800 ml de agua desmineralizada y ajustar el pH a 8.0 o 7.5 empleando HCl concentrado. Ajustar el volumen hasta 1000 mL con aguas desmineralizada. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Tampón Tris-NaCl-EDTA (TNE)

Tris-HCl (pH 8,0) 1,0 mL (1M)

NaCl 2,0 mL (5M)

EDTA (pH 8,0) 0,2 mL (0,5M)

Agua destilada 96,8 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS NO CULTIVABLES DE LOS TUBOS DE LAVA

3.1. CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADN Y ARN MEDIANTE LA TÉCNICA DE CLONACIÓN

En esta fase inicial de la tesis doctoral se llevó a cabo el estudio de diversidad de la comunidad microbiana de las muestras naturales mediante la construcción de genotecas de ADN total y ARN, que, en este caso, para el análisis de los microorganismos metabólicamente activos se empleó la técnica de clonación. Esta metodología se basa en el estudio del gen ARNr 16S y la región ITS, para procariotas y eucariotas, respectivamente, presentes en los ácidos nucleicos extraídos de las comunidades microbianas, mediante la amplificación de estos marcadores por PCR. Utilizando cebadores específicos, se consigue amplificar la región concreta que permitirá caracterizar la comunidad microbiana de estudio, ya sean bacterias, arqueas u hongos. En una segunda fase se inserta cada marcador en un vector o plásmido que se transfiere por transformación celular a un microorganismo modelo o célula competente, en este caso la bacteria *Escherichia coli*. Estas células transformadas se denominan clones y son amplificadas y secuenciadas con cebadores que delimitan la región del gen de estudio insertado en el plásmido para identificar en cada muestra las secuencias de los microorganismos presentes dando lugar a la construcción de genotecas o librerías de clones.

Durante esta primera etapa del estudio de las comunidades microbianas basadas en técnicas de biología molecular, se obtuvieron librerías de clones de muestras tomadas en los tubos de lava “Cueva Honda del Bejenado” (EP01) y “Fuente de la Canaria” (MZ03), de la isla de La Palma. En la primera cueva se construyeron genotecas para la única muestra tomada, EP01-6F, para ADN y ARN de bacterias, y ADN de hongos y arqueas. Del segundo tubo de lava se crearon librerías de clones de ADN y ARN de bacterias, para las muestras MZ03-6F y MZ03-7G. En el caso del resto de las muestras de la “Fuente de la Canaria”, recogidas durante la campaña de muestreo de 2015, así como para las muestras del tubo de lava “Cueva del Llano de los Caños” (MZ04-2B y MZ04-3C), el proceso de extracción de ácidos nucleicos fue infructuoso, no pudiéndose realizar la construcción de genotecas de ADN y ARN. Las muestras recogidas durante la campaña de 2016 fueron utilizadas para analizar las comunidades microbianas presentes

mediante técnicas de secuenciación masiva o HT-NGS, cuyos resultados y discusión se describen en el capítulo 3.2.

Se recogieron un total de 607 clones con insertos del gen ARNr 16S de bacterias presentes en las citadas muestras para construir las genotecas de ADN y ARN. En el caso de las librerías específicas para arqueas y hongos, únicamente se pudieron recoger clones para las muestras EP01-6F. El número de clones utilizados fue menor debido a la escasa diversidad observada inicialmente, especialmente en el caso de arqueas.

3.1.1 GENOTECAS DE LA MUESTRA EP01-6F: CORALOIDES

3.1.1.1 LIBRERÍAS DE CLONES DE ADN Y ARN DE BACTERIAS

De la muestra EP01-6F se generaron un total de cuatro librerías para analizar el ADN total y ARN de bacterias, el ADN de arqueas y de hongos. El estudio de genotecas de ADN total y ARN busca realizar un análisis comparativo, ya que la abundancia y diversidad de las comunidades microbianas que colonizan la zona de estudio pueden verse afectadas por factores externos variables, de manera que permitan el desarrollo de unas comunidades frente a otras en un momento puntual, así como la existencia de ADN de microorganismos que nunca colonizaron el área adheridas al sustrato y que fueron transportados mediante flujos de agua de percolación o por el viento, lo que puede distorsionar la diversidad real (Zepeda Mendoza y col., 2016). De esta forma, el análisis de ambas librerías ofrece una perspectiva más certera mediante el análisis del ARN de la muestra que determina las comunidades metabólicamente activas frente a otras comunidades bacterianas relícticas, en fase de latencia o inactivadas (Díaz-Herraz y col., 2014; Gonzalez-Pimentel y col., 2018).

En la Tabla 3.1 se presenta la librería de clones del ADN total de la muestra EP01-6F. Se agruparon un total de 100 clones en 46 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) mediante la herramienta bioinformática MOTHUR. Para la agrupación de las secuencias en OTUs se fijó un umbral del 97% para la similitud presentada entre ellas, de modo que todas las secuencias que superaran este umbral se las consideraría el mismo filotipo. Posteriormente se tomó la secuencia más representativa de cada OTU para su

clasificación taxonómica comparándola con las secuencias presentes en las bases de datos del NCBI y EzBiocloud, con el objetivo de obtener la identificación más próxima de los microorganismos no cultivables y cultivables, respectivamente.

Los filos más abundantes fueron *Proteobacteria* y *Actinobacteria*, con el 45% y 42% de los clones recogidos, respectivamente. Otros filos presentes en la muestra fueron *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Nitrospirae*, *Chloroflexi* y *Elusimicrobia*, con una abundancia menor al 5% en cada grupo. Solo hubo un filo cuya secuencia más cercana identificada en las bases de datos se encontraba por debajo del 80% de similitud, por lo que se catalogó como “No clasificado”. Valores de similitud por debajo de este umbral no permiten asegurar la correcta clasificación de la secuencia a nivel de filo (Yarza y col., 2014).

Las identificaciones de las secuencias de los clones que presentaron una mayor similitud con las secuencias localizadas en la base de datos del NCBI mostraron una relación muy estrecha con otras secuencias de clones analizadas a partir de muestras de similares características tomadas en los tubos de lava de las Islas Azores, Portugal, con 17 secuencias representativas de las 46 secuencias totales estudiadas. Además, el OTU más abundante fue relacionado con una secuencia obtenida igualmente de estudios análogos realizados en tubos de lava de Nuevo México, EE.UU. Por lo tanto, se obtuvieron 54 clones de los 100 totales directamente emparentados con secuencias de bacterias estudiadas en tubos de lava. El resto de secuencias más cercanas identificadas se aislaron de ecosistemas con un mayor peso de medios subterráneos, como cuevas kársticas, manantiales o rizosferas. Otra característica a destacar es la variabilidad en la pigmentación de las muestras de procedencia de las secuencias más estrechamente relacionadas con los OTUs de esta librería, cuya muestra de origen presentaba una coloración amarilla.

Tabla 3.1 Relaciones filogenéticas de las secuencias correspondientes con el gen ARNr 16S de bacterias. Genoteca de ADN de la muestra EP01-6F.

Nº Acceso	Nº de Clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud
<i>Proteobacteria</i>						
LT854955	10	HE602900	Biofilm localizado en cueva. Eslovenia.	99%	<i>Halochromatium glycolicum</i> (X93472)	90,20%
LT854948	5	JF266429	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99%	<i>Methylocapsa palsarum</i> (jgi.1102276)	98%
LT854991	4	JN672330	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta das Balcoes, Portugal.	99%	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	92,93%
LT854992	1	JN672330	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta da Balcoes, Portugal.	99%	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	92,83%
LT854990	1	JN672330	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta da Balcoes, Portugal.	98%	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	92,56%
LT854971	1	JN850448	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta dos Principiantes, Portugal.	99%	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	92,69%
LT854953	1	JN672480	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal. ¹	99%	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	88,58%
LT854984	3	JN615883	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta da Madre de Deus, Portugal. ¹	100%	<i>Methyloceanibacter marginalis</i> (LPWD01000072)	97,14%
LT854983	3	LN998925	Depósitos de cueva kárstica Molnar Janos, Hungría.	100%	<i>Methyloceanibacter marginalis</i> (LPWD01000072)	98%
LT854956	2	HE602897	Biofilm localizado en cueva. República Checa.	99%	<i>Nitrosococcus halophilus</i> (CP001798)	90,53%
LT854986	2	DQ499328	Biofilm localizado en la cueva de Frasassi, Italia.	100%	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	91,75%
LT854951	2	JN672462	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	99%	<i>Burkholderiales bacterium</i> (LT158233)	93,90%
LT854954	1	JN701063	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Madre de Deus, Portugal.	99%	<i>Aliidongia dinghuensis</i> (KX426600)	92%
LT854949	1	JN672413	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	98%	<i>Pedomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	92,98%

Nº Acceso	Nº de Clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud
LT854970	1	EU881113	Suelo de bosque primario.	99%	<i>Phaselicystis flava</i> (EU545827)	86,38%
LT854960	1	KJ877524	Arrozal.	95%	<i>Azoarcus buckelii</i> (AJ315676)	88,86%
LT854950	1	JN672417	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	96%	<i>Tistrella bauzanensis</i> (GQ240228)	89,74%
LT854968	1	JF265891	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta dos Montanheiros, Portugal.	99%	<i>Desulfacinum hydrothermale</i> (AF170417)	85,09%
LT854987	1	AB656921	Arrozal.	96%	<i>Azospirillum halopraeferens</i> (Z29618)	91,16%
LT854961	1	HE653873	Cueva, Bulgaria.	99%	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	92,42%
LT854978	1	HM186127	Subsuelo.	97%	<i>Azoarcus indigenes</i> (AF011345)	89,26%
Actinobacteria						
LT854957	27	KC331729	Tapete microbiano blanco. Tubo de lava Pahoehoe, EE.UU.	99%	<i>Euzebya tangerina</i> (AB478418)	92,52%
LT854958	1	FN297998	Tumbas romanas de la necrópolis de Carmona, España.	99%	<i>Euzebya tangerina</i> (AB478418)	92,66%
LT854959	3	EU132508	Suelo de pradera no perturbada.	97%	<i>Solirubrobacter phytolaccae</i> (KF459924)	91,58%
LT854977	3	KC331797	Tapete microbiano blanco. Cueva Roots Galore, EE.UU.	99%	<i>Pseudonocardia bannensis</i> (FJ817375)	94,45%
LT854993	1	GU318369	Suelo, Corea del Sur.	97%	<i>Pseudonocardia spinospora</i> (AJ249206)	96,67%
LT854972	1	KC554485	Suelo proveniente de la Montaña Yanshan, China.	99%	<i>Sporichthya polymorpha</i> (KB913029)	88,61%
LT854976	1	HF952279	Suelo proveniente de un manantial.	98%	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	91,83%
LT854967	1	KF785663	Rizosfera.	92%	<i>Micromonospora yasonensis</i> (JN989295)	92,08%
LT854989	1	JQ071677	Suelo de desierto semiárido.	97%	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94,27%
LT854964	1	HM185982	Subsuelo.	99%	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	83,29%

Capítulo 3: Caracterización de las Comunidades Microbianas no cultivables de los tubos de lava

Nº Acceso	Nº de Clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud
LT854963	1	EU335216	Suelo. Horizonte C.	99%	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	83,15%
LT854962	1	KT905762	Suelo proveniente de la cuenca hidrográfica Nihewan, China.	97%	<i>Streptomyces similanensis</i> (AB773850)	86,47%
Nitrospirae						
LT854975	2	JX221819	Sedimento de acuífero.	100%	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (FP565575)	87,45%
LT854973	1	JN672491	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta do Natal, Portugal.	99%	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (FP565575)	87,58%
LT854952	1	JN672474	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	99%	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (CP011801)	96,90%
LT854988	1	JN801132	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta do Lemos, Portugal.	99%	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	95,81%
Planctomycetes						
LT854969	1	JF265891	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta do Carvao, Portugal.	93%	<i>Algisphaera agarilytica</i> (AB845176)	78,83%
LT854981	1	KC358408	Agua recogida de cavidad.	94%	<i>Blastopirellula cremea</i> (JF748733)	87,73%
LT854980	1	JQ700600	Agua oligotrófica.	98%	<i>Pirellula staleyi</i> (CP001848)	90,39%
Firmicutes						
LT854985	1	HM187359	Subsuelo.	96%	<i>Thermanaeromonas toyohensis</i> (AB062280)	83,70%
LT854982	1	KX035066	Rizosfera asociada a <i>Salicornia europaea</i> L.	99%	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	99,57%
Chloroflexi						
LT854965	1	GU219793	Depósitos de hialoclastita.	96%	<i>Litorilinea aerophila</i> (JQ733906)	82,22%
LT854979	1	EU134007	Suelo de pradera no perturbada.	95%	<i>Anaerolinea thermolimosa</i> (AB109437)	82,19%
Elusimicrobia						
LT854974	1	JN672018	¹ Tapete microbiano rosa. Algar do Carvao, Portugal.	93%	<i>Endomicrobium proavitum</i> (CP009498)	82,20%

¹Tubos de lava de las Islas Azores.

Las relaciones filogenéticas de la librería de ARN para identificar las bacterias metabólicamente activas de la muestra EP01-6F de “Cueva Honda del Bejenado”, Isla de La Palma (Tabla 3.2) deparó resultados con apreciables diferencias respecto a la librería de ADN de la misma muestra. El grupo filogenético más abundante, con notable diferencia, superando el 53% de los clones totales analizados (98) fue el de *Actinobacteria*. El segundo filo en abundancia, pero con una representatividad menor, fue *Proteobacteria*, con más de un 36%. Se identificaron clones clasificados en otros filos, pero con una representación residual.

Los resultados del análisis de las secuencias representativas de los 35 OTUs generados ofrecieron una caracterización similar a la observada en la librería de ADN, con respecto al origen o fuente de aislamiento de las secuencias más próximas presentes en la base de datos del NCBI. Más de la mitad de los OTUs presentaron una relación muy próxima con secuencias de estudios realizados en tubos de lava. Es más, 17 OTUs fueron estrechamente relacionados filogenéticamente con registros obtenidos en estudios realizados en los tubos de lava de las Azores, situada en la región Macaronésica, al igual que la Isla de La Palma. En total, hasta 80 clones de los 98 recogidos en esta librería fueron relacionados con referencias de tubos de lava. El OTU con un mayor número de clones de la librería de bacterias metabólicamente activas coincide con la secuencia identificada para el OTU más abundante de la librería de ADN, que se identificó con el género *Euzebya* (número de acceso AB478418). En lo que respecta al origen en la coloración de los tapetes microbianos, las secuencias relacionadas con los OTUs en esta librería, al igual que lo observado en el análisis de la librería de ADN, presentaron pigmentaciones diferentes, entre ellas marrón, blanca, amarilla e incluso rosa.

Tabla 3.2. Relaciones filogenéticas de las secuencias correspondientes con el gen ARNr 16S de bacterias. Genoteca de ARN de la muestra EP01-6F.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
<i>Actinobacteria</i>						
LT854996	42	KC331729	Tapete microbiano blanco. Tubo de lava Pahoehoe, EE.UU.	99	<i>Euzebya tangerina</i> (AB478418)	92,97
LT855006	7	JN615923	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre de Deus, Portugal.	100	<i>Frankia discariae</i> (KB891152)	95,31
LT854999	1	JN615923	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre de Deus, Portugal.	99	<i>Frankia discariae</i> (KB891152)	94,42
LT855004	1	JN672384	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	100	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (CP000481)	85,66
LT855014	1	JN616120	¹ Arcilla amarillenta. Tubo de lava Gruta dos Principiantes, Portugal.	99	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93,53
<i>Proteobacteria</i>						
LT854995	8	JN801129	¹ Tapete microbiano marrón. Furna do Lemos, Portugal.	99	<i>Methylocapsa palsarum</i> (jgi.1102276)	98,22
LT855003	7	JF266446	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	92,73
LT854997	2	JF266456	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	92,73
LT855002	1	JF266446	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	98	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	88,62
LT855000	2	JF266307	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	98	<i>Oceanibaculum pacificum</i> (FJ463255)	89,97
LT855025	2	KM242560	Microbiota proveniente del aparato digestivo de un escarabajo, Costa Rica.	99	<i>Serratia myotis</i> (KJ739884)	98,43
LT855013	1	KF879088	Espiga de trigo.	99	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>piscium</i> (FJ168539)	99,86
LT855009	1	FJ479291	Suelo de pradera no perturbada.	99	<i>Syntrophus</i>	86,86

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LT855008	1	GQ214090	Loess.	98	<i>aciditrophicus</i> (CP000252)	
					<i>Syntrophus aciditrophicus</i> (CP000252)	86,75
LT854994	1	JN672033	¹ Tapete microbiano rosa. Algar do Carvao, Portugal.	99	<i>Phenylobacterium koreense</i> (AB166881)	89,96
LT855015	1	JN592694	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta do Natal, Portugal.	99	<i>Pedomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	95,17
LT854998	1	JF266307	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	95	<i>Skermanella rosea</i> (LT545982)	90,41
LT855028	1	JN615908	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre de Deus, Portugal.	99	<i>Skermanella rosea</i> (LT545982)	91,87
LT855028	1	JN615908	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre de Deus, Portugal.	99	<i>Skermanella rosea</i> (LT545982)	91,87
LT855027	1	DQ499328	Biofilm localizado en la cueva de Frasassi, Italia.	99	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	91,22
LT855024	1	JQ675490	Cuevas kársticas, EE.UU.	99	<i>Pseudomonas peli</i> (AM114534)	98,79
LT855023	1	NR_117348	Agua purificada.	99	<i>Undibacterium oligocarboniphilum</i> (GQ379228)	99,88
LT855022	1	LK936274	Biofilm localizado en la cueva de Buda, Hungría.	97	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96,35
LT855001	1	JN850142	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Balcoes, Portugal.	97	<i>Amorphus coralli</i> (KB894580)	93,39
LT855005	1	JN850142	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Balcoes, Portugal.	99	<i>Methylovirgula ligni</i> (FM252034)	93,53
LT855017	1	AB649024	Arrozal.	99	<i>Variovorax ginsengisoli</i> (AB245358)	99,03
<i>Planctomycetes</i>						
LT855016	1	EU135153	Suelo de pradera no perturbada.	98	<i>Gemmata obscuriglobus</i> (ABGO01000325)	87,30
LT855012	1	KJ192111	Suelo de bosque de Pinus	96	<i>Telmatocola sphagniphila</i>	85,93

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LT855011	1	FR863662	massoniana. Zona subterránea de un manantial termal.	95	(JN880417) <i>Telmatocola sphagniphila</i> (JN880417)	85,20
LT855007	1	CU925538	Digestor anaerobio de E.D.A.R.	97	<i>Bythopirellula goksoyri</i> (KF607112)	96,42
<i>Acidobacteria</i>						
LT855021	1	HE653878	Pinturas prehistóricas en la cueva Magura, Bulgaria.	97	<i>Thermoanaerobaculum aquaticum</i> (JMFG01000020)	86,73
LT855018	1	JN671995	¹ Tapete microbiano rosa. Algar do Carvao, Portugal.	98	<i>Stenotrophobacter terrae</i> (KF840371)	96,66
<i>Firmicutes</i>						
LT855010	1	LN573571	Zona de desechos de hormiguero.	95	<i>Anoxynatronum sibiricum</i> (AF522323)	86,25
LT855020	1	JX221790	Sedimento subterráneo de acuífero.	99	<i>Paenibacillus endophyticus</i> (KC447384)	98,92
<i>Nitrospirae</i>						
LT855019	1	JQ675422	Cuevas kársticas, EE.UU.	99	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (FP565575)	93,25
<i>Thermodesulfobacteria</i>						
LT855026	1	HM445006	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Achada, Portugal.	95	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i> (JF346116)	84,05

¹Tubos de lava de las Islas Azores.

La diversidad bacteriana a nivel de filo identificada en ambas librerías está muy extendida entre cuevas kársticas y tubos de lava de diferentes localizaciones geográficas del planeta (Barton y Jurado, 2007; Pasic y col., 2010; Lee y col., 2012; Hathaway y col., 2014). Estudios similares en las Islas Azores y Hawái identificaron una distribución taxonómica semejante a la obtenida en el presente estudio, con los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria* como los grupos taxonómicos superiores más abundantes en los tubos de lava (Hathaway y col., 2014; Riquelme y col., 2015a). La abundante representación de las proteobacterias es sobradamente conocida en los diferentes medios subterráneos ya que, como indicaban Barton y colaboradores (2007), y Lee y colaboradores (2012), constituye la mayor parte de las bacterias identificadas mediante técnicas moleculares. La intervención de grupos clasificados dentro del filo *Proteobacteria* en la bioformación de espeleotemas observados en los tubos de lava de las Islas Azores fue propuesta por De los Rios y colaboradores (2011). Estos autores sugirieron que estos microorganismos desempeñaban un papel determinante por su capacidad metabólica, mediante la cual se favorecía la precipitación de hidróxido y óxido de hierro, de forma que estas estructuras minerales podrían servir de puntos de nucleación participando de forma activa y pasiva en la formación de biominerales.

Los OTUs más abundantes clasificados en el filo *Proteobacteria* tuvieron a *Halochromatium*, *Thioalcalovibrio*, *Methylocapsa* y *Methyloceanibacter* (números de acceso X93472, AF126545, jgi.1102276 y LPWD01000072), como bacterias cultivables más cercanas. Estos son grupos descritos como halófilos, desnitrificantes y metanotrofos, respectivamente (Caumette y col., 1997; Sorokin y col., 2001; Dedysh y col., 2015), por lo que podrían desempeñar un papel relevante en los ciclos de nutrientes. Otras referencias clasificadas en este filo describen a microorganismos oxidantes del azufre y amoníaco, principalmente.

En los tubos de lava se ha prestado especial atención al estudio de los grupos de actinobacterias. Su versátil metabolismo ha sido también el motivo por el cual las actinobacterias han sido asociadas a la bioformación de espeleotemas presentes en ambientes subterráneos, así como a la difusión de pigmentos que cubren paredes y techos de tubos de lava y otras cuevas. De este modo, algunos autores han demostrado la capacidad de diferentes grupos de actinobacterias para formar cristales minerales (Groth y col., 2001;

Laiz y col., 2003). Miller y colaboradores (2014) constataron la asociación entre estructuras celulares de actinobacterias con minerales basados en calcita y silicatos de magnesio sobre los coralloides presentes en el tubo de lava Ana Heva, Isla de Pascua, Chile. Riquelme y colaboradores (2015b) observaron la presencia de esferas de vaterita, un polimorfo de carbonato cálcico, relacionadas con la formación de biofilms microbianos pigmentados sobre paredes y techos de los tubos de lava en Hawái y las Azores. Más recientemente, Maciejewska y colaboradores (2017) analizaron la capacidad metabólica de cepas del género *Streptomyces* aisladas de moomilk, cuya formación, basada en la disposición de cristales de carbonato cálcico (CaCO_3), podría ser originada por este grupo de actinobacterias.

El potencial metabólico para la producción de compuestos bioactivos (CBA) con interés científico e industrial por parte de las bacterias clasificadas en este filo ha sido motivo de estudio en los últimos años (Miao y Davies, 2010; Tiwari y Gupta, 2012, Guo y col., 2015). Este interés ha promovido investigaciones dirigidas a la búsqueda de mecanismos de producción de CBA en comunidades presentes en distintos espeleotemas que aparecen en las cuevas. Así, Maciejewska y colaboradores (2016 y 2018), y Axenov-Gribanov y colaboradores (2016), llevaron a cabo estudios con el objetivo de analizar la diversidad del filo *Actinobacteria* colonizando moonmilks presentes en cuevas kársticas, buscando evaluar la capacidad de producir CBA, especialmente por parte del género *Streptomyces*. Riquelme y colaboradores (2017) realizaron trabajos en tubos de lava de Canadá y las Islas Azores para identificar la capacidad enzimática y antimicrobiana de actinobacterias aisladas en dichos ambientes subterráneos.

Las identificaciones de los clones en ambas librerías analizadas mostraron disparidad en la coloración de las muestras de procedencia de las secuencias más cercanas, de manera que pudiera poner en entredicho la hipótesis que autores como Portillo y González (2009), y Porca y colaboradores (2012), plantearon asignando a determinados grupos de bacterias la responsabilidad de la pigmentación amarilla de las paredes y techos de las cuevas. Si bien Lavoie y colaboradores (2017) asociaban a las actinobacterias como causantes de las pigmentaciones observadas en tubos de lava y otras cuevas, no parece que existan unos grupos específicos que produzcan las coloraciones exclusivamente. Aparte de lo analizado en el presente estudio para las identificaciones de clones, Hathaway y

colaboradores (2014) y Riquelme y colaboradores (2015a) demostraron que no había ningún patrón de grupos de bacterias causantes de la pigmentación.

Por otra parte, se observaron diferencias entre las dos librerías de ADN y ARN de la muestra de estudio, principalmente en cuanto a la abundancia, pero también a nivel de diversidad, de los grupos de bacterias identificados. La genoteca de ARN mostró una representatividad mayor de actinobacterias, especialmente el OTU (número de acceso AB478418) estrechamente relacionado con la especie *Euzebya tangerina* (Kurahashi y col., 2010), la cual también fue muy representativa en la genoteca de ADN. Poco se conoce de la actividad metabólica de este microorganismo, aislado en un pepino de mar (*Holothuria edulis*). El género *Euzebya* proviene de un linaje con escasos grupos identificados que se clasifican en la clase *Nitriliruptoria*. De hecho, hasta el año 2018 no se identificó a la segunda especie del único género de la familia *Euzebyaceae*, siendo a su vez el único grupo del orden *Euzebyales*, la *Euzebya rosea* (Yin y col., 2018). Ambas especies parecen estar estrechamente asociadas a ambientes oceánicos, sin embargo, algunos autores han identificado secuencias pertenecientes a este género en otros ambientes subterráneos (Díaz-Herrera, tesis, 2014; Riquelme y col., 2015b). Los siguientes OTUs con mayor número de clones en la genoteca de ADN fueron identificados como *Solirubrobacter* y *Pseudonocardia* (KF459924 y FJ817375, respectivamente), los cuales fueron originalmente aislados en rizosferas. El ADN de estos dos grupos pudo llegar por percolación desde el exterior para no conseguir adaptarse al tubo de lava, ya que en la librería de bacterias metabólicamente activas no se apreció referencia alguna a estos géneros. En este caso *Frankia* (KB891152) fue el segundo OTU más abundante de actinobacterias. Igualmente, este grupo proviene principalmente del área de influencia de raíces de plantas, y es muy conocido por su capacidad para fijar nitrógeno de forma libre (Schrempf, 2013).

Por tanto, se aprecia una menor diversidad de bacterias en el análisis de comunidades metabólicamente activas, presentando un mayor número de clones en aquellos OTUs más representativos. Los estudios comparativos entre librerías de ADN y ARN han sido anteriormente utilizados puesto que ofrece una visión más real sobre la diversidad microbiana activa (Gonzalez y col., 2005; Díaz-Herrera y col., 2013). Por ello, la identificación de grupos de bacterias metabólicamente activas ofrece una aproximación más certera

sobre los posibles procesos biogeoquímicos que puedan estar sucediendo en el área de estudio.

3.1.1.2 LIBRERÍAS DE ADN PARA ARQUEAS Y HONGOS

El estudio de las poblaciones de arqueas (Tabla 3.3) siguió el mismo procedimiento de análisis llevado a cabo en el estudio de las comunidades bacterianas, utilizando las mismas bases de datos, puesto que el marcador estudiado para procariotas es el gen ARNr 16S. Únicamente se construyó una librería de ADN comprendida por 44 clones debido a la escasa diversidad observada. De estos, 28 clones fueron clasificados en el filo *Thaumarchaeota*, cuatro en el filo *Euryarchaeota* y tres clones sin identificar a este nivel por obtener menos de un 80% de similitud con la secuencia más próxima desde el punto de vista filogenético. Otras tres secuencias no fueron asociadas a ninguna secuencia presente en las bases de datos, y otras seis fueron identificadas como bacterias. La distribución dentro del filo más abundante está repartida entre dos grupos a nivel de orden en exclusividad. Así, 14 secuencias de clones analizadas fueron clasificadas como *Nitrosopumilales* y 13 como *Nitrososphaerales*. De este último grupo, se identificaron el mismo número de secuencias con el género *Nitrososphaera*, entre los que se incluyen las seis secuencias agrupadas en el OTU más abundante de la muestra. El siguiente género más representativo fue *Nitrosopumilus*, clasificado dentro del grupo *Nitrosopumilales*, con 12 clones identificados. Otras dos secuencias de clones clasificados en el orden *Nitrosopumilales* obtuvieron menos del 90% de similitud con el género *Nitrosopumilus*, por lo que a este nivel se les considera secuencias “no clasificadas”. Los clones identificados como *Euryarchaeota* fueron todos clasificados en la clase *Thermoplasmata*, de los que tres se agruparon dentro del orden *Methanomassiliicoccales* y una secuencia no clasificada a este nivel. De las bacterias identificadas, solo dos secuencias de clones fueron clasificadas, dentro del filo *Actinobacteria*, las cuatro restantes presentaron un índice de similitud por debajo del 80%, mínimo para clasificar a nivel de filo. No se pudo extraer ARN de arqueas, por lo que no se realizó el análisis de comunidades metabólicamente activas de este dominio.

El filo *Thaumarchaeota* fue identificado por Brochier-Armanet y colaboradores (2008) siendo un grupo presente en una amplia variedad de

ecosistemas, desde suelos, medios marinos y ambientes con elevadas temperaturas (Pester y col., 2011). Este filo ha atraído la atención de la comunidad científica por contar con miembros capaces de oxidar el amoníaco aeróbicamente, ofreciendo el primer ejemplo de arqueas nitrificantes, característica hasta entonces propia de linajes de proteobacterias en exclusiva (Konneke y col., 2005). El género más abundante, *Nitrososphaera*, fue aislado por Tourn y colaboradores (2011) en una muestra de suelo y constituye uno de los miembros del filo *Thaumarchaeota* con capacidad de oxidar el amoníaco. El siguiente género en abundancia, *Nitrosopumilus*, aislada por Konneke y colaboradores (2005), constituye la primera arquea nitrificante descubierta. De esta forma, los microorganismos de los tubos de lava podrían desempeñar un papel importante en el ciclo del nitrógeno a nivel global.

De forma residual, se identificaron arqueas clasificadas en el filo *Euryarchaeota*, donde se clasifican los microorganismos metanogénicos (Angelidaki y col., 2011). Solo se pudo identificar arqueas en este grupo clasificadas hasta nivel de orden. Así, *Methanomassiliicoccales* (Paul y col., 2012) fue el grupo identificado, con miembros estrictamente anaerobios con un metabolismo diseñado para generar metano a través de CO₂. Liu y Whitman (2008) describieron los distintos ecosistemas donde se pueden encontrar este tipo de microorganismos, entre ellos aguas termales y otros ambientes subterráneos.

De esta forma, los resultados obtenidos de las librerías de bacterias y arqueas de esta muestra parecen seguir una línea metabólica común, ya que la identificación de los microorganismos más próximos parece indicar que se están llevando a cabo procesos bioquímicos relacionados con los ciclos del nitrógeno, carbono y azufre.

Tabla 3.3 Análisis de secuencias de clones de ADN de arqueas para la muestra EP01-6F.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
Thaumarchaeota						
LR556639	6	GQ926233	Sedimento proveniente del fondo del mar.	99%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	97.27
LR556645	1	EU307011	Suelo. Horizonte C.	99%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	95.36
LR556647	1	GQ926233	Sedimento proveniente del fondo del mar.	98%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	96.19
LR556652	1	GQ926233	Sedimento proveniente del fondo del mar.	95%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	94.01
LR556657	1	GQ926233	Sedimento proveniente del fondo del mar.	95%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	93.86
LR556661	1	GQ926233	Sedimento proveniente del fondo del mar.	96%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	95.51
LR556663	1	GQ926233	Sedimento proveniente del fondo del mar.	97%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	96.19
LR556665	1	KJ644832	Humedal, China.	99%	<i>Nitrososphaera viennensis</i> (CP007536)	92.49
LR556641	5	KP866345	Profundidades del Lago Mayor, Italia.	99%	<i>Candidatus Nitrosotalea devanaterrea</i> (LN890280)	92.91
LR556643	2	KX077498	Humedal.	99%	<i>Candidatus Nitrosotalea devanaterrea</i> (LN890280)	93.72
LR556646	1	KC437222	Manantial de agua carbonatada.	97%	<i>Candidatus Nitrosotalea devanaterrea</i> (LN890280)	92.12
LR556655	1	HQ532954	Aguas del río Yangtze, China.	96%	<i>Candidatus Nitrosotalea devanaterrea</i> (LN890280)	90.35
LR556640	5	EU481559	Sedimento del Salar de Huasco, Chile.	99%	<i>Candidatus Nitrosopelagicus brevis</i> (CP007026)	93.87
LR556648	1	FJ718987	Agua localizada en Mina.	93%	<i>Candidatus Nitrosopelagicus brevis</i> (CP007026)	88.13
LR556644	1	EU781997	Lago del ártico canadiense a 2 metros de profundidad.	84%	-	< 80

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
Euryarchaeota						
LR556642	3	HM187462	Subsuelo.	99%	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> (CAJE01000013)	85.79
LR556651	1	KC955197	Formaciones microbianas sumergidas en un lago alcalino.	96%	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> (CAJE01000013)	82.79
LR556649	1	KR089766	Suelo.	90%	<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i> (BAGX02000040)	< 80
LR556650	1	KC955187	Formaciones microbianas sumergidas en un lago alcalino.	99%	¹ <i>Methanococcus voltae</i> (NR_104985)	< 80
LR556658	1	JN002457	Biofilms asociados a alteraciones de rocas ultramáficas.	95%	<i>Candidatus Methanoplasma termitum</i> (CP010070)	< 80
LR556656	1	EU781997	Lago del ártico canadiense a 2 metros de profundidad.	89%	¹ <i>Methanococcus maripaludis</i> (NR_104984)	< 80
Bacteria						
LR556664	1	KC955187	Formaciones microbianas sumergidas en un lago alcalino.	96%	¹ <i>Thermotoga profunda</i> (NR_133904)	< 80
LR556660	1	KC955194	Formaciones microbianas sumergidas en un lago alcalino.	92%	¹ <i>Thermotoga profunda</i> (NR_133904)	< 80
LR556653	1	JX080265	Campo de gas natural, China.	96%	¹ <i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (NR_112972)	86
LR556654	1	KM273683	Sedimento proveniente del fondo de un lago.	95%	¹ <i>Thermodesulfobium narugense</i> (NR_074466)	< 80
LR556659	1	KF141771	Turberas, EE.UU.	92%	¹ <i>Thermodesulfobium narugense</i> (NR_074466)	< 80
LR556662	1	KC955187	Formaciones microbianas sumergidas en un lago alcalino.	97%	¹ <i>Leifsonia rubra</i> (NR_028012)	80

¹Registros obtenidos de la base de datos NCBI, enfrentando las secuencias a la base de datos “16S ribosomal RNA sequences “Bacteria and Archaea”, que excluye microorganismos no cultivables. Aquellas secuencias con índices de similitud por debajo del 80%, valor mínimo fijado para clasificar a la secuencia de estudio a nivel de filo, se incluyen en las identificaciones de los distintos filos puesto que las secuencias más próximas están clasificadas en tales grupos.

El último apartado del estudio de las comunidades de microorganismos realizado utilizando la técnica de clonación en la muestra EP01-6F estuvo centrado en la identificación de poblaciones fúngicas totales (Tabla 3.4). Al igual que sucediera en arqueas, no se pudo disponer de ARN de hongos y levaduras, por lo que no se realizó el análisis de las comunidades metabólicamente activas.

La diversidad observada en esta librería fue mayor, con respecto a los resultados obtenidos en la librería de arquea. Por lo tanto, se analizaron un mayor número de clones para tratar de determinar la abundancia en la comunidad fúngica. Así, se utilizaron 63 clones para la construcción de esta librería, resultando en un total de 19 OTUs. Para su identificación y clasificación, se enfrentaron las secuencias de clones representativos a la base de datos del NCBI, incluyendo las secuencias de muestras ambientales y organismos no cultivables, así como excluyéndolas para determinar el microorganismo cultivable más cercano.

Por clasificación taxonómica, el filo más abundante observado fue *Ascomycota*, con 33 clones agrupados en este taxón, dando lugar a ocho OTUs del total. El OTU más abundante contó con 17 secuencias de clones, lo que supone casi el 27 % de la abundancia total de las secuencias estudiadas. Este OTU obtuvo como secuencia más próxima a aquella que identificaba a una especie del género *Penicillium*, con un 99% de similitud, originalmente aislado en sedimentos de la cueva de Naracoorte, en Australia. El género *Penicillium* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para producir una gran variedad de oxalatos de diferentes metales (Gadd, 2008b) y degradar diferentes tipos de minerales, desde silicatos de hierro y magnesio, hasta aluminosilicatos (Mehta y col., 1979; Rossi, 1979; Sterflinger, 2000), y es, junto a *Aspergillus*, uno de los grupos más comunes identificados en cuevas y otros ambientes subterráneos (Cunningham y col., 1995; Vaughan y col., 2011). Igualmente, *Penicillium* es un género que, junto con otros hongos filamentosos, contiene especies que tienen la capacidad de producir pigmentos amarillos (Viggiano y col., 2018), así como rojos y naranjas (Chaurasia y col., 2005; Méndez y col., 2011). El siguiente grupo más abundante dentro del filo *Ascomycota* fue *Sagenomella*, con siete secuencias de clones identificadas. Es un género con poca constatación en ambientes subterráneos, habiéndose encontrado hasta el momento en un túmulo de Takamatsuzuka y Kitora, en Japón, y se piensa que podría incidir en el

biodeterioro de este patrimonio histórico (Sugiyama y col., 2017). De presencia más reducida, fue el género *Leptodontidium*, un grupo con escasa presencia en cuevas, y únicamente una cita en cuevas y minas de Canadá, asociados a murciélagos (Vaneerwolf y col., 2013), aunque sí se ha determinado su presencia en raíces de coníferas y en áreas de bosques contaminados por su tolerancia a metales pesados (Menkis y col., 2005; Berthelot y col., 2016).

El siguiente OTU más abundante se clasificó en el filo *Mucoromycota*, con 11 secuencias de clones clasificadas en este taxón. Sin embargo, aun observándose una elevada representatividad en la muestra, este grupo no presentó una amplia diversidad en OTUs, ya que únicamente se clasificó un OTU dentro de este filo. La secuencia más próxima a este OTU se identificó con una especie del género *Mortierella*. Este género ha sido anteriormente encontrado en cuevas de diferentes países y sobre cadáveres de murciélagos (Nováková, 2009; Jurado y col., 2010b; Man, 2015, Nováková y col., 2018). Además, *Mortierella* es un género frecuentemente localizado en micorrizas de coníferas y otras especies vegetales debido a la capacidad de solubilizar fósforo, de modo que queda biodisponible para la vegetación (Osorio y Habte, 2013; Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2018).

Más diverso, aunque no tan abundante, se situó el filo *Basidiomycota*, con seis OTUs que contenían ocho clones. Este filo es muy común y abundante en cuevas y otros ambientes subterráneos (Nováková y col., 2014; Zhang y col., 2017), especialmente asociadas al patrimonio cultural y su biodeterioro (Duan y col., 2017; Mitovba y col., 2017). Algunos basidiomicetos tienen la capacidad de oxidar manganeso, de forma que podría incidir en la alteración de los minerales que contienen este metal (Carmichael y col., 2015).

Se generó un OTU, situado en tercer lugar por la abundancia de clones que lo conforman, con 10 secuencias, que se identificó como “no clasificado” puesto que la herramienta BLAST solamente alineó un 17% de la secuencia (filo *Zoopagomycota*) con aquella más próxima registrada en la base de datos, por lo tanto, con ese nivel de cobertura tan bajo, no es posible asignar una clasificación taxonómica al citado OTU. La secuencia más próxima obtenida de análisis con la base de datos que incluía secuencias de microorganismos no cultivables provenía de raíces de coníferas como origen del ADN

estudiado, lo que junto con otras referencias identificadas en el estudio de la librería de ADN para hongos de la muestra EP01-6F, sugiere una relación entre microorganismos localizados en zonas de influencias de *Pinus canariensis*, común en la zona.

Por último, dos OTUs con una única secuencia obtuvieron un porcentaje de similitud por debajo del 80% o con rango de cobertura de alineamiento bajo, por lo que no pudieron ser clasificados. Casi la totalidad de las secuencias más próximas a los OTUs estudiados fueron el resultado del análisis de muestras tomadas en suelos de diferente naturaleza, pero principalmente cuevas y tumbas, así como micorrizas. De los resultados obtenidos se desprende una fuerte influencia de los hongos con la zona de influencia de las raíces, así como grupos que han sido asociados al biodeterioro de patrimonio cultural.

Tabla 3.4 Análisis de secuencias de clones de ADN de hongos para la muestra EP01-6F.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso NCBI (cultivable)	Similitud (%)
Ascomycota						
LR540061	17	JF429679	Sedimentos de la cueva Naracoorte, Australia.	99	<i>Penicillium</i> sp. (JF429679)	99
LR540064	7	LC177646	Tumba Kitora, Japón.	99	<i>Sagenomella griseoviridis</i> (LC177646)	99
LR540066	3	KJ701477	Rizosfera de maizal.	80	¹ <i>Lobothallia praeradiosa</i> (KT180162)	85
LR540067	2	HQ022030	Ectomicorriza en suelo forestal.	88	<i>Leptodontidium</i> sp. (DQ069034)	83
LR540068	1	DQ069034	Micorriza de <i>Pinus silvestris</i> .	98	<i>Leptodontidium</i> sp. (DQ069034)	98
LR540074	1	GQ169325	Aislados clínicos.	99	<i>Sagenomella</i> sp. (GQ169325)	99
LR540072	1	GU366682	Suelo forestal.	100	<i>Pseudeurotium bakeri</i> (GU934582)	94
Mucoromycota						
LR540062	11	HG936566	Suelo arado.	99	<i>Mortierella</i> sp. (KU612377)	98
No clasificado						
LR540063	10	KM359794	Micorrizas de Pinos, Escocia.	88	² <i>Piptocephalis</i> sp. (JX312517)	< 80
Basidiomycota						
LR540065	3	KF493989	Rizosfera de tomatera.	83	¹ <i>Basidiomycota</i> sp. (KF359632)	84
LR540071	1	JN032559	Rizosfera en bosque de coníferas.	85	<i>Basidiomycota</i> sp. (KF359632)	82
LR540070	1	HE605274	Manchas negras en la cueva de Lascaux, Francia.	86	<i>Basidiomycota</i> sp. (KF359632)	83
LR540069	1	EF635643	Rizosfera de <i>Kobresia myosuroides</i> .	90	<i>Tyromyces wynneae</i> (KT390136)	82
LR540076	1	FJ210728	Bosque poblado por <i>Pinus</i> sp. y <i>Quercus</i>	99	<i>Amphinema</i> sp. (JN943914)	98

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso NCBI (cultivable)	Similitud (%)
LR540079	1	KP814278	<i>ilex</i> . Restos de hojarasca y madera deteriorados en bosque pináceo.	86	<i>Corticium confine</i> (KP814278)	86
Otros hongos						
LR540078	1	GQ219839	Suelo forestal.	99	funga sp. (KR698923)	93
LR540077	1	HE605257	Manchas negras en la cueva de Lascaux, Francia.	< 80	² funga sp. (JN569131)	90
LR540073	1	HG008779	Moonmilk en túnel de Paranhos, Portugal.	99	¹ funga sp. (KY322652)	93
Metazoa						
LR540075	1	JN799848	Arena intermareal.	< 80	<i>Marionina tumulicola</i> (JN799848)	< 80

¹ La identificación se obtuvo mediante el alineado de menos del 50% de las secuencias de estudio y más cercana presente en la base de datos.

² La identificación se obtuvo mediante el alineado de menos del 20% de las secuencias de estudio y más cercana presente en la base de datos.

3.1.2 GENOTECAS DE MZ03-6F Y MZ03-7G: COMPARATIVA

3.1.2.1 GENOTECAS DE MZ03-6F DE ADN TOTAL Y ARN

De forma paralela al estudio de las comunidades microbianas presentes en el tubo de lava de la “Cueva Honda del Bejenado”, se realizó un análisis comparativo, basado en la construcción de librerías de clones para la caracterización de las comunidades de bacterias que colonizaban dos muestras muy próximas en el tubo de lava “Fuente de La Canaria”. Estas muestras que, aun estando distanciadas algo menos de un metro, diferían en el sustrato colonizado y en la coloración de las poblaciones de microorganismos.

De esta forma se construyeron para su análisis librerías del ADN total y del ARN, para estudiar las bacterias metabólicamente activas, de las muestras MZ03-6F y MZ03-7G. MZ03-6F se caracterizó por una distribución de colonias, principalmente de coloración amarilla, asentadas sobre un sustrato de roca de lava, mientras que MZ03-7G, presentó una colonización de comunidades blancas sobre un sustrato arcilloso que aparecía cubriendo la roca de lava.

La librería de clones generada para estudiar el ADN total de la muestra MZ03-6F se construyó con un total de 125 clones agrupados en 64 OTUs (Tabla 3.5). Al igual que la metodología implementada con las librerías construidas para el estudio de comunidades bacterianas a través del ADN total y metabólicamente activas llevadas a cabo en la muestra EP01-6F, se utilizaron las bases de datos de NCBI y EZBiocloud para su clasificación. El filo más diverso y abundante fue *Proteobacteria*, con 27 OTUs y un 46,4% de la abundancia total de clones. Los OTUs más abundantes se identificaron con los géneros *Thiohalomonas* y *Endothiovibrio*, quimiolitoheterótrofos que son especies desnitrificantes y oxidantes del azufre (Sorokin y col., 2001; Sorokin y col., 2007; Bazylnski y col., 2017). De esta forma, las diferentes referencias a grupos del filo *Proteobacteria* identificadas en la muestra podrían indicar la relevancia de este tipo de metabolismo microbiano en los tubos de lava.

Hay que destacar que se identificaron cinco OTUs cuya secuencia de bacteria cultivable más próxima apuntaba al género *Porphyrobacter* (número de acceso AB548216), cuya única especie identificada *P. uvarum*, se aisló

originalmente de una cepa de vid (Nogi y col., 2014). La presencia de esta bacteria no debe de extrañar puesto que el municipio de Mazo destaca por su tradición agropecuaria, presentando viñedos de uva Malvasía. Otros miembros del filo *Proteobacteria*, como los géneros *Methylocapsa* (jgi.1102276), *Methyloceanibacter* (AP014648) y *Methylocystis* (FN422003), identificados en la muestra, son microorganismos metanotrofos. Fernandez-Cortes y colaboradores (2015) y Webster y colaboradores (2018) determinaron que las cuevas actuaban como sumidero del metano atmosférico, atribuyendo ese papel a este tipo de microorganismos.

A continuación, le siguió el filo *Actinobacteria*, con un 34,4% en abundancia de clones y 14 OTUs. Es decir, sumando la abundancia del filo *Proteobacteria* hay más de un 80% de las secuencias estudiadas que se clasificaron en dos filos únicamente. La secuencia que se identifica con *Euzebya* (AB478418) volvió a tener importancia en esta muestra, siendo el tercer OTU más abundante del total y el segundo más abundante dentro de las actinobacterias. En este caso, el filotipo más abundante de la muestra se identificó con *Streptoalloteichus* (AB184722), como bacteria cultivable más cercana. Las especies de este género fueron originalmente consideradas como *Streptomyces*, hasta que la revisión de los análisis quimiotaxonómicos escindió el género para dar al actual *Streptoalloteichus* (Tomita y col., 1978; Tamura y col., 2008). Este grupo es poco frecuente en ambientes subterráneos, normalmente se pueden encontrar en suelos, apareciendo referencias bibliográficas de cepas aisladas de áreas costeras con capacidad para producir compuestos antimicrobianos (Srivibool, 2006). El miembro no cultivable más próximo en este caso se obtuvo de un estudio de comunidades microbianas blancas en los tubos de lava de Roots Galore, en Nuevo México, EE.UU. De nuevo se vuelve a observar la inconsistencia de la relación entre grupos de bacterias y la distribución de pigmentación en la muestra. Se identificaron hasta siete OTUs con el género *Aciditerrimonas* (número de acceso AB517669), si bien uno de los OTUs, que consta de solo una secuencia, presenta una similitud que únicamente alcanzaba para clasificarla a nivel de clase: *Acidimicrobiia*. *Aciditerrimonas* es un género reductor de hierro y ha sido anteriormente identificado en suelos de lava (Itoh y col., 2011; Kim y col., 2018).

De forma muy poco representativa aparecieron los filos *Acidobacteria* y *Gemmatimonadetes*, con valores por debajo del 5%, y con presencia más

residual, por debajo del 2% de representación, se situaron los filos *Nitrospirae*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Aquificae*, *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*. Estos grupos, al igual que los identificados en la muestra EP01-6F, son muy frecuentes en cuevas y tubos de lava (Barton y Jurado, 2007; Pasic y col., 2010; Lee y col., 2012; Hathaway y col., 2014. Algo más de un 2% de los clones totales no pudieron ser identificados a nivel de filo.

El análisis de las secuencias de clones de la librería MZ03-6F ADN total determinó la fuerte vinculación existente con comunidades de bacterias que habitan tubos de lava de las Islas Azores y de los EE.UU. De hecho, el 65,6% de las secuencias estudiadas provenían de estudios de tubos de lava en estas localizaciones, lo que se corresponde con el 47,69% de los OTUs totales de la biblioteca de clones. Es más, únicamente el 11,2% de los OTUs analizados encontró una mayor similitud con secuencias estudiadas en trabajos no relacionados con ambientes subterráneos.

Tabla 3.5 Relaciones filogenéticas de las secuencias correspondientes con el gen ARNr 16S de bacterias. Genoteca de ADN de la muestra MZ03-6F.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
<i>Proteobacteria</i>						
LT855035	15	JN607020	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Agulhas, Portugal.	99	<i>Thiohalomonas denitrificans</i> (EF117909)	92.90
LT855042	5	HE602900	Tapete microbiano amarillo en cueva. Eslovenia.	99	<i>Endothiovibrio diazotrophicus</i> (HQ379738)	90.75
LT855031	5	JF266474	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Burkholderiales bacterium</i> (LT158233)	93.72
LT855044	4	HM444896	Tapete microbiano blanco. Parque Nacional de los Volcanes de Hawái, EE.UU.	96	<i>Poalibacter uvarum</i> (AB548216)	91.78
LT855030	2	JN607023	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Agulhas, Portugal.	99	<i>Poalibacter uvarum</i> (AB548216)	98.27
LT855045	2	HE653873	Tapete microbiano sobre pinturas rupestres en la cueva de Magura, Bulgaria.	99	<i>Poalibacter uvarum</i> (AB548216)	92
LT855041	2	JF266428	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Poalibacter uvarum</i> (AB548216)	97.84
LT855058	1	KJ615253	Filtro de carbón activo en E.T.A.P.	98	<i>Poalibacter uvarum</i> (AB548216)	87.49
LT855076	2	JN592677	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta do Natal, Portugal.	100	<i>Euryhalocaulis caribicus</i> (ASJA01000004)	87.82
LT855090	2	LK936271	Microorganismos presentes en las aguas termales del sistema kárstico de Buda, Bulgaria.	99	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (KB911255)	97.86
LT855074	2	JN592694	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta do Natal, Portugal.	98	<i>Pedomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	94.38
LT855040	1	JF265847	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos Montanheiros,	89	<i>Pedomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	85.29

Capítulo 3: Caracterización de las Comunidades Microbianas no cultivables de los tubos de lava

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LT855087	1	HE602895	Portugal. Tapete microbiano amarillo en cueva. Eslovenia.	99	<i>Halochromatium glycolicum</i> (X93472)	92.44
LT855080	1	HM445226	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Branca Opala, Portugal.	99	<i>Thioalcalovibrio denitrificans</i> (AF126545)	91.77
LT855057	1	JF266167	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	99	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> (CP001359)	85.44
LT855034	1	JF266265	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	99	<i>Methylocystis bryophila</i> (FN422003)	90.67
LT855056	1	GQ402822	Suelo pantanos de turba.	99	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	96.84
LT855036	1	HM445367	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos Principiantes, Portugal.	99	<i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> (AP014648)	95.84
LT855039	1	JF265717	¹ Tapete microbiano blanco. Furna do Lemos, Portugal.	99	<i>Desulfosoma profundum</i> (HM056226)	85.96
LT855081	1	KC331558	Cultivo de manzanas, China.	97	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	90.71
LT855077	1	DQ823204	Microorganismos aislados en el Monumento Nacional Oregon Caves, EE.UU.	99	<i>Methylocapsa palsarum</i> (JGI.1102276)	97.64
LT855084	1	EU861921	Suelo de pradera abonada con nitrógeno.	95	<i>Methyloligella solikamskensis</i> (JQ773444)	87.84
LT855068	1	KJ568494	Rizosfera de typha, río Bai, Rumanía.	97	<i>Caldimonas</i> sp. (HF562216)/ <i>Burkholderia kururiensis</i> (BAMQ01000301) *	89.42
LT855067	1	KJ750959	Microorganismos presentes en la cueva Asperge, Francia.	99	<i>Polaromonas jejuensis</i> (BCY001000058)	99.46
LT855065	1	EU786144	Rizosfera de algodón.	94	<i>Rhodovastum atsumiense</i> (AB381935)	88.90
LT855062	1	JN672033	¹ Tapete microbiano rosa. Algar do Carvão, Portugal.	99	<i>Phenylobacterium koreense</i> (AB166881)	90.09

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LT855086	1	JN615656	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta da Malha, Portugal.	99	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	92.03
Actinobacteria						
LT855029	18	KC331797	Tapete microbiano blanco. Tubo de lava Roots Galore, EE.UU.	99	<i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> (AB184722)	94.92
LT855043	9	KC331754	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Pahoehoe, EE.UU.	99	<i>Euzebya tangerina</i> (AB478418)	92.30
LT855052	2	JN615870	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Terra Mole, Portugal.	98	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94.19
LT855047	2	JN178925	Espeleotemas de las cavernas de Kartchner, EE.UU.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	93.33
LT855048	2	JN409199	Rizosfera del cultivo de <i>Cucumis sativus</i> (pepino).	98	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	90.34
LT855075	1	JF266483	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	92.55
LT855060	1	EU335216	Suelo. Horizonte C.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	82.80
LT855049	1	HM445106	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Balcoes, Portugal.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	92.67
LT855050	1	JN701043	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Madre de Deus, Portugal.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	93.20
LT855070	1	LN563819	Zona de desechos de hormiguero.	93	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	88.59
LT855051	2	EU431721	Moonmilk localizado en la cueva Bus de la Foos, Italia.	99	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93.80
LT855082	1	EU132508	Suelo de pradera no perturbada.	97	<i>Solirubrobacter ginsenosidimutans</i> (EU332825)	91.78
LT855059	1	EU132829	Suelo de pradera no perturbada.	97	<i>Streptomyces aomiensis</i> (AB522686)	87.89
LT855091	1	KC331699	Tapete microbiano marrón.	95	<i>Crossiella equi</i> (AF245017)	91.51

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
			Tubo de lava Cueva Escondido, EE.UU.			
Acidobacteria						
LT855046	2	KM108194	Suelo forestal.	98	<i>Arenimicrobium luteum</i> (KM659878)	85.56
LT855089	1	FJ004686	Rizosfera de <i>Festuca ovina</i> , Holanda.	99	<i>Terriglobus saanensis</i> (CP002467)	84.87
LT855073	1	EU131970	Suelo de pradera no perturbada.	99	<i>Terriglobus albidus</i> (KP334258)	85.96
LT855071	1	HQ864161	Suelos sedimentarios de la meseta del Tibet.	99	<i>Blastocatella fastidiosa</i> (JQ309130)	90.01
LT855128	1	HQ597081	Suelo de pradera.	99	<i>Candidatus Koribacter</i> (CP000360)	82.81
Gemmatimonadetes						
LT855066	1	LN680114	Microorganismos presentes en las aguas termales del sistema kárstico de Buda, Bulgaria.	99	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	85.73
LT855066	1	LN680114	Microorganismos presentes en las aguas termales del sistema kárstico de Buda, Bulgaria.	99	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	85.73
LT855078	1	HM445084	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Balcoes, Portugal.	97	<i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i> (CP007128)	86.27
Acquifae						
LT855069	1	HE603177	Biofilm presente en la cueva de Altamira, España.	97	<i>Phorcysia thermohydrogeniphila</i> (HQ336972)	82.03
LT855037	1	JF266331	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	99	<i>Thermosulfidibacter takaii</i> (AP013035)	81.66
Bacteroidetes						
LT855088	1	HE861072	Suelo de rizosfera de <i>Saxifraga oppositifolia</i> .	94	<i>Lentimicrobium saccharophilum</i> (DF968182)	82.02
LT855061	1	JN672301	¹ Tapete microbiano marrón.	97	<i>Mucilaginibacter defluvii</i> (JQ955677)	87.80

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
Gruta da Balcoes, Portugal.						
<i>Chloroflexi</i>						
LT855054	1	HM444866	Tapete microbiano amarillo. Parque Nacional de los Volcanes de Hawái, EE.UU.	98	<i>Flexilinea flocculi</i> (DF968179)	80.88
LT855053	1	JF922570	Tubería de agua potable.	97	<i>Bellilinea caldifistulae</i> (BBXX01000016)	86.69
<i>Firmicutes</i>						
LT855038	1	JF265708	¹ Tapete microbiano blanco. Furna do Lemos, Portugal.	99	<i>Hellobacillus mobilis</i> (AB100835)	83.87
LT855032	1	JF265866	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos Montanheiros, Portugal.	99	<i>Desulfofundulus thermocisternus</i> (DTU33455)	82.77
<i>Nitrospirae</i>						
LT855079	1	JN615671	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta da Malha, Portugal.	100	<i>Nitrospira calida</i> (HM485589)	95.04
LT855033	1	JF266003	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Malha, Portugal.	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (CP011801)	95.69
<i>Planctomycetes</i>						
LT855072	1	FJ748810	Sedimentos del delta del río de las Perlas, China.	96	<i>Thermostilla marina</i> (KR872395)	80.26
<i>Verrucomicrobia</i>						
LT855085	1	AY874111	Verrucomicrobia no cultivable aislada en toba calcárea.	98	<i>Pedosphaera parvula</i> (ABOX00000000.2)	92.59
No clasificados						
LT855055	1	JN672494	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta do Natal, Portugal.	99	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> (CP000481)	< 80
LT855083	1	LN870653	Tapete microbiano localizado en mina abandonada de pirrotita, Alemania.	97	<i>Gelria glutamica</i> (AF321086)	< 80
LT855063	1	JF833922	Microorganismos localizados en	97	<i>Thermoanaerobacter uzonensis</i> (EF530067)	< 80

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
			mina de potasio.			
¹ Tubos de lava de las Islas Azores.						

Los resultados observados tras analizar la comunidad de bacterias metabólicamente activas en la librería de clones de la muestra MZ03-6F (Tabla 3.6) mostraron un cambio en la distribución de abundancia de los grupos taxonómicos estudiados en la librería de clones de ADN total de la misma muestra. En este caso, de los 90 clones analizados, 50 fueron clasificados dentro del filo *Actinobacteria*, suponiendo, aproximadamente, el 55,55% de la muestra total, siendo *Euzebya* el filotipo más representativo de la muestra con más del 31%. El siguiente OTU en abundancia de secuencias de clones se identificó con el género *Pseudonocardia* (número de acceso FJ817375), un grupo distribuido por numerosos ecosistemas, que es muy común en suelos, donde se puede encontrar asociado a la rizosfera de diferentes vegetales (Duangmal y col., 2009; Li y col., 2010; Zhao y col., 2011). Este grupo ha sido cuantiosamente documentado en estudios de diversidad microbiana en cuevas y tubos de lava (Barton y col., 2007; Porca y col., 2012; Lavoie y col., 2017) y es conocido por su capacidad de producir metabolitos secundarios de interés para la industria (Bérdy, 2005).

El filo *Proteobacteria* aparece como segundo grupo en importancia al presentar un 40% de abundancia total, sin embargo, es el grupo más diverso, al clasificar en este filo a 24 de los 36 OTUs generados. *Povalibacter* volvió a desempeñar un papel relevante dentro de este filo, siendo el grupo más abundante. Este género pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, y se han identificado otros grupos en la muestra con un metabolismo propio de bacterias quimiolitoheterótrofas, donde se han observado desnitrificadores y oxidantes del azufre (números de acceso EF117909, HQ379738 y X93472). Al igual que lo observado en la librería de ADN de esta muestra, los metilo- y metanotrofos vuelven a destacar apareciendo OTUs identificados con los grupos *Methylocapsa*, *Methyloceanibacter*, *Hyphomicrobium* (KB911255, AB794104 y AF235089), pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*, el grupo *Methylibium* (CP000555) clasificados dentro de la clase *Betaproteobacteria*, así como el grupo *Candidatus Methylospiralis* (FP565575), aunque este se clasifica dentro del filo *Nitrospirae*.

Del resto de grupos en la genoteca cabe destacar la referencia al único miembro cultivable de la clase Subdivisión 6 de *Acidobacteria*, pero con un porcentaje de similitud tan bajo que no permite la clasificación en la especie *Vicinamibacter silvestris* (KP761690).

Habría que resaltar las fuentes de aislación del ADN de la mayor parte de las secuencias analizadas en la librería de clones de la presente muestra, donde más del 86,66% de estos estuvieron estrechamente relacionados con secuencias analizadas en diferentes tipos de cuevas y otros ambientes subterráneos. Así, más del 72% de las secuencias de clones de la librería analizada, que se corresponden con el 44% de los OTUs totales, fueron estrechamente relacionadas con secuencias de genotecas obtenidas de estudios homólogos en tubos de lava de las Islas Azores. La coloración de las colonias que cubren la superficie de esta muestra difería de la observada en aquellas secuencias más cercanas. De este modo, se observó una relación más directa de OTUs con secuencias de colonias que formaban parte de biofilms de color blanco (10) que en aquellos que presentaron una mayor similitud con comunidades de coloración amarilla (seis). Es más, el OTU más abundante de la librería mostró una relación directa con una secuencia obtenida del análisis de comunidades de microorganismos de coloración blanca.

La comparación entre librerías de la misma muestra refuerza las hipótesis de la implicación de ciertos grupos de organismos en los ciclos del nitrógeno, azufre y carbono, puesto que el estudio de los microorganismos metabólicamente activos ha permitido comprobar que las bacterias en el tubo de lava están o pueden estar desarrollando mecanismos que intervienen en dichos ciclos. Por otra parte, al igual que lo observado en el estudio de las librerías de la muestra del tubo de lava “Cueva Honda del Bejenado” (EP01-6F), se ha observado que las comunidades más activas se corresponden con las clasificadas como actinobacterias, mientras que las proteobacterias, aun teniendo un papel relevante en el ecosistema, presentan un mayor número de poblaciones en estado latente.

En este sentido, la falta de información relativa al género más abundante, *Euzebya*, no permite discutir acerca de su papel en la comunidad microbiana o de sus interacciones metabólicas con el sustrato. Sin embargo, hay que señalar que Xu y colaboradores (2018) secuenciaron recientemente el genoma de una bacteria clasificada en este género e identificaron varios clústeres de genes que parecen estar involucrados en los ciclos oceánicos del nitrógeno, carbono, fósforo y azufre.

Tabla 3.6 Relaciones filogenéticas de las secuencias correspondientes con el gen ARNr 16S de bacterias. Genoteca de ARN de la muestra MZ03-6F.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
<i>Actinobacteria</i>						
LT855097	28	JF265742	¹ Tapete microbiano blanco. Furna do Lemos, Portugal.	99	<i>Euzebya tangerina</i> (AB478418)	92.14
LT855093	15	HM445255	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Branca Opala, Portugal.	100	<i>Pseudonocardia bannensis</i> (FJ817375)	94.67
LT855092	1	KJ013356	Suelo.	94	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	89.93
LT855107	1	JF266483	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	93.12
LT855096	1	JN701043	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Madre de Deus, Portugal.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	93.46
LT855113	1	JQ738835	Rocas superficiales del cráter Lonar, India.	98	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94.32
LT855121	1	JN616183	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta dos Principiantes, Portugal.	96	<i>Saccharopolyspora phatthalungensis</i> (JNYW01000388)	89.95
LT855123	1	NR_117239	Muestra de suelo, Egipto.	95	<i>Amycolatopsis fastidiosa</i> (AJ400710)	94.65
LT855116	1	GU318369	Suelo de jardín.	98	<i>Pseudonocardia spinospora</i> (AJ249206)	96.85
<i>Proteobacteria</i>						
LT855101	4	JF266428	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	97.64
LT855105	3	HE653873	Tapete microbiano sobre pinturas rupestres en la cueva de Magura, Bulgaria.	96	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	91.90
LT855111	2	HE653873	Tapete microbiano sobre pinturas rupestres en la cueva de Magura, Bulgaria.	98	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	92.38
LT855104	3	HQ721134	¹ Tapete microbiano amarillo. Furna do Lemos, Portugal.	99	<i>Thiorhodospira sibirica</i> (AGFD01000020)	91.01
LT855118	2	HM445377	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos	99	<i>Reyranella graminifolii</i> (AB839882)	88.83

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LT855114	2	JN541177	Principiantes, Portugal. Lodos activos en E.D.A.R.	99	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (KB911255)	98.50
LT855110	2	HQ721167	¹ Tapete microbiano amarillo. Furna do Lemos, Portugal.	99	<i>Lysobacter thermophilus</i> (JQ746036)	91.76
LT855108	2	JN607020	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Agulhas, Portugal.	99	<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i> (CP001339)	91.38
LT855127	1	KF836203	Pozos en desierto de Mojave, EE.UU.	99	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> (D16213)	97.62
LT855099	1	KT998738	Rizosfera de <i>Populus</i> .	99	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	95.86
LT855098	1	EF664366	Pradera.	99	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> (AF235089)	95.85
LT855106	1	JF266474	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Burkholderiales bacterium</i> (LT158233)	93.14
LT855095	1	HM445396	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos Principiantes, Portugal.	99	<i>Nitrosospora multiformis</i> (CP000103)	90.45
LT855094	1	HE602877	Biofilm localizado en cueva. Eslovenia.	99	<i>Ampullimonas aquatilis</i> (JX458401)	91.08
LT855124	1	HE602874	Biofilm localizado en cueva. República Checa.	96	<i>Methylibium petroleiphilum</i> (CP000555)	94.94
LT855103	1	JF266429	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Methylocapsa palsarum</i> (jgi.1102276)	97.86
LT855102	1	KC255355	Moonmilk localizado en la cueva Grotta Genziana, Italia.	99	<i>Acidibacter ferrireducens</i> (JX412366)	92.94
LT855109	1	JN642997	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos Buracos, Portugal.	99	<i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> (AB794104)	96.24
LT855125	1	LN867237	Cueva de Altamira.	99	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	97.75
LT855126	1	LN680196	Biofilm situado en el sistema kárstico de Buda, Hungría.	95	<i>Oceanibaculum indicum</i> (AMRL01000052)	88.61
LT855120	1	JQ978524	Muestra de suelo de permafrost.	99	<i>Oxalicibacterium faecigallinarum</i>	89.21

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LT855115	1	NR_113983	Suelo de cultivo de jengibre.	99	(AB469788)	
LT855117	1	DQ906830	Muestra de suelo subterráneo, Omán.	99	<i>Lysobacter koreensis</i> (AB166878)	99.06
LT855112	1	HM445066	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta das Balcoes, Portugal.	96	<i>Curvibacter delicatus</i> (AF078756)	97.87
					<i>Desulfacinum infernum</i> (L27426)	86.05
Acidobacteria						
LT855100	2	HQ598537	Suelo boscoso.	99	<i>Vicinamibacter silvestris</i> (KP761690)	85.25
Chlorobi						
LT855122	1	JQ675528	Muestra de agua localizada en la Cueva de Lechuguilla, EE.UU.	96	<i>Ignavibacterium album</i> (CP003418)	82.02
Nitrospirae						
LT855119	1	JN643036	¹ Tapete microbiano rojo-marrón. Gruta dos Buracos, Portugal.	98	<i>Candidatus Methylomirabilis oxyfera</i> (FP565575)	92.37

¹Tubos de lava de las Islas Azores.

3.1.2.2 GENOTECAS DE MZ03-7G DE ADN TOTAL Y ARN

La muestra MZ03-7G fue analizada siguiendo la misma metodología implementada en las muestras EP01-6F y MZ03-6F, para el estudio del ADN total de bacterias, así como el ARN para el análisis de las comunidades metabólicamente activas. En el primer caso (Tabla 3.7), la librería de clones para el estudio del ADN total contó con 95 secuencias que se agruparon en 48 OTUs. En la presente genoteca destacó la abundancia del filo *Proteobacteria*, con más del 70,5% del total de clones analizados, agrupados en más del 58% de los OTUs generados. El OTU más representativo del filo, y también de la muestra, se identificó con el género *Endothiovibrio* (número de acceso HQ379738), cuya única especie tiene la capacidad de fijar el nitrógeno y oxidar el azufre, como se discutió anteriormente. El segundo y tercer OTU más abundante del filo se identificó con los géneros *Piscinibacterium* (LT158233) y *Thiohalomonas* (FMWD01000026). Estos grupos disponen de un metabolismo adaptado para reducir el nitrato (Sorokin y col., 2007; Sheu y col., 2016). Estos tres OTUs contenían el 33,68% de las secuencias estudiadas en la presente librería, lo que deja entrever que la comunidad microbiana presente en la muestra podría jugar un papel en el ciclo del nitrógeno. Otros OTUs clasificados dentro del mismo filo fueron identificados con secuencias de bacterias metilotrofas, oxidantes del azufre, hierro y manganeso.

En segundo lugar, el filo *Acidobacteria* presentó cerca del 17% de las secuencias en la librería. La mayor parte de los OTUs clasificados en este filo, incluido el OTU más abundante, fueron clasificados en la clase *Blastocatellia*, también llamada Subdivisión 4, todos los cuales son quimioorganoheterótrofo (Huber y col., 2014; Wust y col., 2016), pero debido a la baja similitud obtenida con las secuencias más cercanas, no se puede discutir qué papel puede desempeñar dicha comunidad en la muestra. Otras secuencias fueron clasificadas en la clase Subdivisión 6, donde la secuencia más cerca se corresponde con *Luteitalea pratensis* (CP015136), también quimioorganoheterótrofo (Vieira y col., 2017).

Nitrospirae se situó con un 5,2% de abundancia total. Se identificaron la presencia de microorganismos nitrificantes y metanotrofos (Ettwig y col., 2010; Dong, 2017). A diferencia de la muestra MZ03-6F, tanto para ADN y ARN, la presencia del filo *Actinobacteria* fue testimonial, sobrepasando levemente el 2% de representatividad total en la librería. Otros grupos con

menor representación fueron *Chloroflexi*, *Aquifae*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicutes*.

Los resultados obtenidos de las secuencias de los clones representativos de cada OTU generado en la librería, como sucedió en el análisis de librerías de clones de comunidades bacterianas de las muestras EP01-6F y MZ03-6F, mostraron una relación más cercana con secuencias analizadas en estudios sobre tubos de lava y otros entornos subterráneos. El OTU más abundante mostró un 100% de similitud con secuencias analizadas en la genoteca de ADN total de la muestra MZ03-6F, registrada con antelación en la base de datos de NCBI debido a un estudio previo para determinar la relación de comunidades bacterianas con pigmentación amarilla de diferentes tubos de lava de la Isla de La Palma (no publicado). Aun así, hubo una similitud más próxima a secuencias obtenidas en los tubos de lava de las Azores, con 17 OTUs relacionados con secuencias de esta localización, frente a los ocho OTUs cuyas referencias más cercanas fueron secuencias de clones incluidas en las genotecas de las muestras EP01-6F y MZ03-6F. Por otra parte, tal y como se comprobó en los análisis de las librerías de clones de las citadas muestras, no se apreció una distribución de la coloración homogénea entre las muestras analizadas y las fuentes de aislamiento de las secuencias más cercanas, ya que se incluyen tapetes microbianos blancos, amarillos o marrones.

Tabla 3.7 Relaciones filogenéticas de las secuencias correspondientes con el gen ARNr 16S de bacterias. Genoteca de ADN de la muestra MZ03-7G.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
<i>Proteobacteria</i>						
LR130612	16	LT855042	¹ Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	100	<i>Endothiovibrio diazotrophicus</i> (HQ379738)	90.55
LR130653	1	LT854956	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Cueva Honda del Bejenado, España.	99	<i>Endothiovibrio diazotrophicus</i> (HQ379738)	90.90
LR130613	10	JF266474	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	100	<i>Burkholderiales bacterium</i> (LT158233)	93.49
LR130628	1	JF266474	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	89	<i>Burkholderiales bacterium</i> (LT158233)	85.70
LR130615	6	LT855035	Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	100	<i>Thiohalomonas denitrificans</i> (FMWD01000026)	92.59
LR130616	3	JN615722	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta da Malha, Portugal.	99	<i>Nitrosospira multiformis</i> (CP000103)	90.48
LR130617	3	LT855042	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	98	<i>Methylohalomonas lacus</i> (DQ834966)	91.10
LR130618	3	GQ262947	Desechos celulósicos en vertedero simulado.	99	<i>Methyloceanibacter marginalis</i> (LPWD01000072)	96.83
LR130620	2	JN592692	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta do Natal, Portugal.	99	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	90.77
LR130642	1	DQ499328	Biofilm localizado en la cueva de Frassassi, Italia.	96	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	89.14
LR130650	1	KC569942	Tapete microbiano amarillo. Parque Nacional de los Volcanes de Hawái, EE.UU.	98	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	88.68
LR130622	2	NR_026429	Suelo urbano, Rusia.	98	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (KB911255)	98.40
LR130623	2	HE614779	Mina de arsénico y oro.	99	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96.54

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LR130625	2	JN615827	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Terra Mole, Portugal.	99	<i>Methylocapsa palsarum</i> (jgi.1102276)	97.53
LR130626	1	JN615883	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre de Deus, Portugal.	96	<i>Methyloceanibacter marginalis</i> (LPWD01000072)	95.73
LR130627	1	LN555098	Mina de carbón.	90	<i>Pandoraea thiooxydans</i> (CP011568)	86.11
LR130629	1	LT855035	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	99	<i>Halochromatium glycolicum</i> (X93472)	92.30
LR130630	1	JF266428	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	97.57
LR130638	1	JQ978524	Suelo de permafrost.	99	<i>Oxalibacterium faecigallinarum</i> (AB469788)	89.31
LR130635	1	AM991267	Agua de manantial sistema kárstico subterráneo.	99	<i>Desulfacinum infernum</i> (L27426)	85.76
LR130637	1	HM445320	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta dos Principiantes, Portugal.	100	<i>Pedomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	95.07
LR130646	1	LT855042	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	90	<i>Nitrosococcus halophilus</i> (CP001798)	85.80
LR130647	1	JN672541	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre do Natal, Portugal.	96	<i>Methyloceanibacter superfactus</i> (LPWF01000023)	82.50
LR130634	1	KJ782948	Lodos activos de E.D.A.R. para residuos petroquímicos.	98	² <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> (KF952438)	87
LR130656	1	JF266426	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	97	<i>Thiopropfundum lithotrophicum</i> (AB468957)	89.56
LR130657	1	JF266134	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	96	<i>Thalassobaculum fulvum</i> (KP976094)	82.02
LR130632	1	DQ499328	Biofilm localizado en la cueva de Frassassi, Italia.	96	<i>Pseudomonas syzygii</i> (U28237)	90.43
LR130659	1	JQ978582	Suelo de permafrost.	92	<i>Methyloversatilis universalis</i>	87.62

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud (AFHG01000027)	Similitud (%)
Acidobacteria						
LR130614	7	JN615993	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Malha, Portugal.	99	<i>Arenimicrobium luteum</i> (KM659878)	86.04
LR130654	1	JN615993	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Malha, Portugal.	92	<i>Arenimicrobium luteum</i> (KM659878)	85.80
LR130619	2	EF665859	Suelo forestal.	98	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	96.80
LR130640	1	HQ598537	Suelo forestal.	99	² <i>Luteitalea pratensis</i> (CP015136)	87
LR130643	1	HQ598537	Suelo forestal.	96	² <i>Luteitalea pratensis</i> (CP015136)	86
LR130658	1	FJ478605	Suelo de pradera no perturbada.	97	² <i>Luteitalea pratensis</i> (CP015136)	87
LR130649	1	HM187266	Subsuelo.	99	<i>Terriglobus aquaticus</i> (HQ436501)	84.28
LR130651	1	LT855042	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	85	<i>Vicinamibacter silvestris</i> (KP761690)	84
LR130655	1	LT855071	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	99	<i>Brevitalea aridisoli</i> (KF840370)	92.74
Nitrospirae						
LR130621	2	JN607000	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Agulhas, Portugal.	99	<i>Candidatus Nitrospira nitrosa</i> (CZQA01000015)	96.17
LR130636	1	JN417587	Suelo.	98	<i>Nitrospira calida</i> (HM485589)	84.89
LR130624	1	JX221833	Sedimento subterráneo de acuífero.	99	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (FP565575)	92.98
LR130639	1	JX221819	Sedimento subterráneo de acuífero.	97	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (FP565575)	85.47
Actinobacteria						
LR130631	1	HM186993	Subsuelo.	92	<i>Solirubrobacter taibaiensis</i> (KF551107)	82.66
LR130633	1	FJ478959	Suelo de pradera no perturbada.	99	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	92.31

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
<i>Chloroflexi</i>						
LR130641	1	JF266129	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta da Ribeira do Fundo, Portugal.	99	<i>Thermomarinilinea lacunifontana</i> (AB669272)	88.24
LR130652	1	HQ397138	Suelo.	98	² <i>Litorilinea aerophila</i> (JQ733906)	84
<i>Acquifae</i>						
LR130645	1	HM186617	Subsuelo.	99	<i>Thermosulfidibacter takaii</i> (AP013035)	82.18
<i>Gemmatimonadetes</i>						
LR130648	1	JN592666	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta Madre do Natal, Portugal.	99	² <i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i> (CP007128)	86
<i>Firmicutes</i>						
LR130644	1	JN672510	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta Madre do Natal, Portugal.	97	<i>Thermolithobacter ferrireducens</i> (AF282253)	82.80

¹Tubos de lava de las Islas Azores.

²Registros obtenidos de la base de datos NCBI, enfrentando las secuencias a la base de datos “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea”, que excluye microorganismos no cultivables

Los resultados obtenidos tras analizar los 99 clones distribuidos en 42 OTUs finales de la librería de clones de bacterias metabólicamente activas de la muestra MZ03-7G (Tabla 3.8) mostraron una distribución taxonómica muy similar a la reproducida en la librería de clones de ADN total de la misma muestra. Si bien la distribución en la abundancia de los filos variaba entre las genotecas de bacterias de la muestra MZ03-6F, presentando mayor representatividad el grupo *Proteobacteria* en la librería de ADN total, siendo *Actinobacteria* el filo más representativo en el caso del estudio de las bacterias metabólicamente activas de la misma muestra, en el caso de la muestra MZ03-7G no fue así. De hecho, *Proteobacteria* siguió siendo el grupo más abundante, seguido de *Acidobacteria*. Ambos presentaron un 59,6% y 25,25% de abundancia total en la librería de bacterias metabólicamente activas. A diferencia de lo observado en la librería de ADN total de la muestra, *Actinobacteria* sí pareció tener un papel significativo, al presentar algo más de un 10% de abundancia total. Otros grupos en la muestra fueron *Nitrospirae*, *Cyanobacteria* y *Firmicutes*, con escasa abundancia. Los porcentajes de similitud con las secuencias más cercanas de las bases de datos estuvieron siempre por encima del 80%, por lo que todos los OTUs fueron clasificados al menos a nivel de filo.

El filo *Proteobacteria* presentó una amplia diversidad taxonómica representada en los distintos OTUs analizados. Los OTUs más abundantes del filo tuvieron como miembros más próximos a dos géneros quimioorganotrofos, *Permianibacter* (KJ721800), originalmente aislado de microalgas productoras de biofuel (Wang y col., 2014), y *Povalibacter*. Este último género ya ha sido identificado de forma muy representativa en las librerías de MZ03-6F, de manera que se podría especular que su origen estuviera en los lixiviados del suelo superficial. Otros OTUs presentaron una estrecha relación con microorganismos con metabolismo muy dispar, como *Methylocapsa* y *Methylomirabilis* (números de acceso jgi.1102276 y FM252034, respectivamente) metanotrofos y metilotrofos anteriormente identificados, con oxidantes del manganeso como *Pedomicrobium* (Y14313), bacterias desnitrificantes como *Pseudomonas* (AM114534), o bacterias aisladas de suelos o agua potable.

Las acidobacterias presentaron el OTU más abundante en secuencias de clones de toda la muestra. Este coincidió con el OTU más representativo de las acidobacterias en la librería de ADN total, cuya secuencia pertenecía a

la clase *Blastocatellia*. Casi la totalidad de los OTUs analizados se identificaron con las subdivisiones 4 y 6, potencialmente quimioorganotrofos, a excepción del orden *Solibacterales* (NR_134120), pertenecientes a la Subdivisión 3 del filo *Acidobacteria*, el cual podría tratarse de un reductor de hierro (Kulichevskaya y col., 2014).

De forma similar a la información obtenida en la genoteca de ADN total de MZ03-7G, los resultados del estudio de las comunidades de bacterias metabólicamente activas mostraron una estrecha relación con comunidades bacterianas identificadas en las Azores, seguida de secuencias analizadas en la muestra MZ03-6F. En general, se sigue una distribución parecida a la observada en las distintas librerías de comunidades bacterianas de las muestras anteriormente analizadas, destacando las secuencias obtenidas en análisis microbiológicos de tubos de lava y otras cuevas. Igualmente, como se apreció en librerías anteriores, no existió una relación entre la pigmentación de las colonizaciones microbianas de las muestras analizadas en esta tesis doctoral y otras muestras de distinta procedencia donde fueron obtenidas las secuencias más cercanas a los clones estudiados.

Los resultados en ambas librerías de la muestra MZ03-7G la sitúan como un microambiente donde existe una diversidad bacteriana compleja. Con respecto a las diferencias apreciables entre las muestras MZ03-6F y MZ03-7G, muy próximas una de la otra, parece que las características de los distintos sustratos donde se asientan las comunidades, han permitido la diversificación de los diferentes microorganismos. Mientras que MZ03-6F se presentaba sobre roca de lava, en MZ03-7G se comprobó la existencia de un sustrato de textura arcillosa sobre la roca de lava. Este hecho puede deberse a situarse en una zona de lixiviado superficial, debido principalmente a la gran cantidad de microorganismos propios de superficies, como es el caso de las cianobacterias identificadas (HM038000 y CP017245).

Tabla 3.8 Relaciones filogenéticas de las secuencias correspondientes con el gen ARNr 16S de bacterias. Genoteca de ARN de la muestra MZ03-7G.

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
<i>Proteobacteria</i>						
LR130661	12	KF712658	Rizosfera de <i>Paeonia ostii</i> .	99	<i>Permianibacter aggregans</i> (KJ721800)	95.75
LR130695	1	JQ675369	Piscinas originadas en el sistema kárstico Ojo Caliente, EE.UU.	92	<i>Permianibacter aggregans</i> (KJ721800)	89.82
LR130662	6	LT855045	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	99	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	92.71
LR130671	2	JF266428	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	100	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	98.77
LR130663	5	JN672413	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	100	<i>Pedomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	95.31
LR130664	4	JN850475	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta dos Principiantes, Portugal.	100	<i>Methylocapsa palsarum</i> (jgi.1102276)	98.24
LR130665	4	AF336361	Acuífero de sistema kárstico.	99	<i>Polaromonas jejuensis</i> (BCY001000058)	99.55
LR130666	3	HE614785	Mina de arsénico y oro.	99	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96.59
LR130667	3	JN672449	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	99	<i>Dongia rigui</i> (HQ436504)	89.57
LR130668	3	JF266474	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	100	<i>Burkholderiales bacterium</i> (LT158233)	94.15
LR130669	2	JN672033	¹ Tapete microbiano rosa. Algar do Carvao, Portugal.	99	<i>Phenylobacterium koreense</i> (AB166881)	89.44
LR130672	2	HM186019	Subsuelo.	97	<i>Desulfomonile tiedjei</i> (CP003360)	83.64
LR130673	2	KU681664	Agua subterránea obtenida de una mina de carbón abandonada.	99	<i>Pseudomonas peli</i> (AM114534)	98.77
LR130677	1	JN038791	Muestra de suelo de humedales de Chongxi, China.	99	² <i>Geobacter bemidjiensis</i> (CP001124)	84

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LR130680	1	JF429200	Agua potable urbana.	99	<i>Oceanibaculum pacificum</i> (LPXN01000088)	92.15
LR130681	1	DQ906830	Subsuelo.	98	<i>Curvibacter delicatus</i> (BCWP01000019)	97.87
LR130687	1	HM445062	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta da Achada, Portugal	99	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	95.31
LR130689	1	JN672527	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta do Natal, Portugal.	95	<i>Filomicrobium insigne</i> (jgi.1057990)	89.39
LR130690	1	JQ978582	Suelo de permafrost.	99	<i>Oxalicibacterium faecigallinarum</i> (AB469788)	89.79
LR130691	1	JN606985	¹ Gruta das Agulhas, Portugal.	97	² <i>Geothermobacter sp.</i> (AB268315)	87
LR130694	1	JN850142	¹ Tapete microbiano blanco. Algar da Balcoes, Portugal.	99	<i>Methylovirgula ligni</i> (FM252034)	92.96
LR130696	1	JN672391	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta do Natal, Portugal.	99	<i>Hippea alviniae</i> (FR754500)	82.49
LR130698	1	KF771450	Bioreactor metilotrófico desnitrificante.	99	<i>Rhodoferrax saidenbachensis</i> (AWQR01000064)	98.77
<i>Acidobacteria</i>						
LR130660	20	JN850502	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta dos Principiantes, Portugal.	99	<i>Arenimicrobium luteum</i> (KM659878)	87.31
LR130676	1	JF266531	¹ Tapete microbiano blanco. Gruta das Torres, Portugal.	99	² <i>Paludibaculum fermentans</i> (NR_134120)	89
LR130679	1	HM186631	Subsuelo.	96	<i>Vicinamibacter silvestris</i> (KP761690)	91.98
LR130686	1	JN672059	¹ Tapete microbiano blanco. Algar do Carvao, Portugal.	99	<i>Brevitalea aridisoli</i> (KF840370)	94.62
LR130683	1	DQ139448	Catacumbas romanas. Italia.	99	<i>Vicinamibacter silvestris</i> (KP761690)	95.27

Nº Acceso	Nº de clones	Nº Acceso NCBI	Procedencia	Similitud (%)	Nº Acceso EzBioCloud	Similitud (%)
LR130699	1	JN850502	¹ Tapete microbiano amarillo. Gruta dos Principiantes, Portugal.	99	<i>Arenimicrobium luteum</i> (KM659878)	83.41
Actinobacteria						
LR130670	2	KF712861	Rizosfera de <i>Paeonia ostii</i> .	97	<i>Aquihabitans daechungensis</i> (JN033775)	95.52
LR130674	2	LT855060	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	98	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	84.42
LR130682	1	LT855107	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	93.59
LR130684	1	HM445518	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Kaumana, EE.UU.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	91.68
LR130685	1	LT855049	Tapete microbiano amarillo. Tubo de lava Fuente de La Canaria, España.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	93.01
LR130693	1	KC331705	Arcilla orgánica amarilla/naranja Tubo de lava Cueva Escondido, EE.UU.	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94.96
LR130678	1	DQ129258	Aerosoles urbanos, EE.UU.	97	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	94.45
LR130697	1	FJ478959	Suelo de pradera no perturbada.	99	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93.34
Cyanobacteria						
LR130700	1	JF265750	¹ Tapete microbiano blanco. Furna do Lemos, Portugal.	97	² <i>Candidatus Melainabacteria bacterium</i> (CP017245)	85
LR130701	1	EF018525	Rizosfera de Álamo tembloroso con elevadas concentraciones de CO ₂ atmosférico.	97	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> (HM038000)	93.55
Nitrospirae						
LR130688	1	KJ750954	Microorganismos presentes en la cueva Asperge, Francia.	99	<i>Candidatus Methyloirabilis oxyfera</i> (FP565575)	93.08
LR130692	1	JN607027	¹ Tapete microbiano marrón. Gruta das Agulhas, Portugal.	99	<i>Nitrospira calida</i> (HM485589)	96.30
Firmicutes						
LR130675	1	JQ675457	Muestra de agua de Cavernas Carlsbad, EE.UU.	98	<i>Gelria glutamica</i> (AF321086)	83.91

Capítulo 3: Caracterización de las Comunidades Microbianas no cultivables de los tubos de lava

¹Tubos de lava de las Islas Azores.

²Registros obtenidos de la base de datos NCBI, enfrentando las secuencias a la base de datos “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea”, que excluye microorganismos no cultivables

3.1.3 COMPARACIÓN DE LAS GENOTECAS DE BACTERIAS DE LAS TRES MUESTRAS ANALIZADAS

Por último, se ha llevado a cabo un análisis comparativo basado en la distribución taxonómica y la abundancia de los distintos grupos identificados en las librerías construidas a partir del ADN total de bacterias, así como de las comunidades metabólicamente activas presentes en las diferentes muestras. Para ellos se crearon mapas de calor asociativos a nivel de filo, clase, orden y género, como resultado del análisis de las librerías anteriormente descritas. Estos mapas de calor representan la abundancia de los distintos grupos taxonómicos identificados en las genotecas, y su relación mediante la generación de dendrogramas basándose en la distribución de las distintas comunidades. Este análisis ofrece una visión superficial para determinar: 1º, la tendencia presentada entre librerías de la misma muestra; 2º, si existe una relación directa entre genotecas por la localización geográfica de los tubos de lava estudiados. Los mapas de calor representan los grupos taxonómicos con una abundancia igual o superior al 2%, a excepción de la representación a nivel de filo, que incluye todos los grupos identificados.

3.1.3.1 MAPA DE CALOR A NIVEL DE FILO

Se observó una relación más estrecha a nivel de filo (Fig. 3.1) entre las librerías de ADN total, así como en aquellas que describían las comunidades metabólicamente activas de las muestras MZ03-6F y EP01-6F, caracterizadas por presentar colonias de coloración amarilla, pero colonizando distintos sustratos presentes en tubos de lava alejados geográficamente. Por otra parte, MZ03-7G situándose a escasa distancia de MZ03-6F, en el mismo tubo de lava, presentó una distribución diferente, con mayor abundancia de *Proteobacteria* y *Acidobacteria*, siendo este último filo un grupo que aparece antagónico al filo *Actinobacteria*, ya que, si bien se observa la coexistencia de proteobacterias y actinobacterias, no se da la misma situación en el caso de acidobacterias y actinobacterias. De hecho, Wegner y Liesack (2017) observaron que ambos fillos mostraban patrones divergentes en el estudio de la comunidad bacteriana en una mina de carbón. Los grupos identificados como “No asignado” clasificaron a las secuencias con similitud por debajo del

80%, en el caso de filo, 82,5%, en el caso de clase, 85% a nivel de orden y 90% a nivel de género (Yarza y col., 2014).

La distribución semejante a nivel de filo de las muestras MZ03-6F y EP01-6F, podría tener una repercusión decisiva en la coincidencia de la coloración amarilla de las colonias observadas en ambas muestras. Tal y como decía Lavoie y colaboradores (2017), las actinobacterias podrían ser un activo fundamental en esta característica. Sin embargo, los diferentes sustratos donde las distintas comunidades de bacterias se asientan en ambos casos, no parecen indicar que se estén dando las condiciones necesarias para favorecer la formación de los coraloides apreciados en la “Cueva Honda del Bejenado”. Banks y colaboradores (2010) comprobaron que la génesis de este mineral secundario se veía favorecida por la toxicidad que el calcio causaba en las bacterias presentes en muestra de coraloides. Para evitar la toxicidad, las bacterias disponían de mecanismos que le permitían eliminar el exceso de Ca^{2+} mediante procesos de calcificación formando minerales de aragonito, calcita y vaterita. Años más tarde, Miller y colaboradores (2014) constataron la presencia de microorganismos y estructuras asociadas a los minerales anteriormente descritos en los tubos de lava de Ana Heva, Isla de Pascua, Chile.

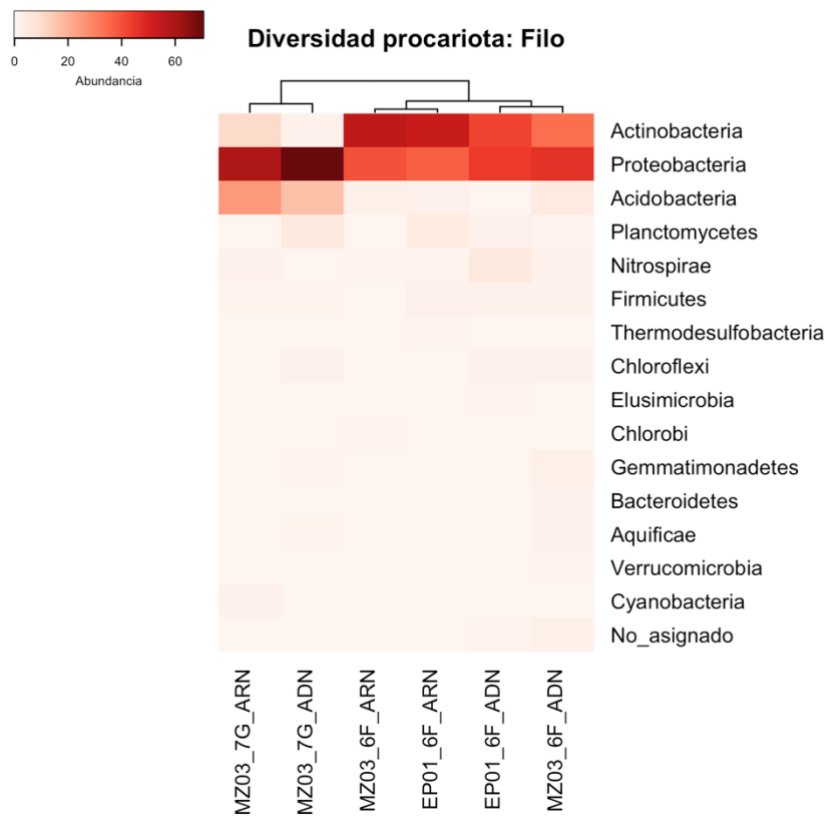


Figura 3.1. Mapa de calor relacionando las distintas librerías de las muestras analizadas por clonación. Análisis taxonómico a nivel de filo.

3.1.3.2 MAPA DE CALOR A NIVEL DE CLASE

El mapa de calor a nivel de clase (Fig. 3.2) cambió ligeramente la perspectiva relacional de las comunidades ya que se diferenciaron dos grupos que se asemejaban en la distribución taxonómica. Por un lado, aquellas cuyo peso determinante se situaban en los grupos del filo *Actinobacteria*, en este caso las librerías de ARN de MZ03-6F y EP01-6F, así como la que estudia el ADN total de EP01-6F, y por otro lado aquellas que se veían más influenciadas por los grupos del filo *Proteobacteria*, principalmente, y *Acidobacteria*, en segundo lugar. Por tanto, las dos genotecas de MZ03-7G y la correspondiente a MZ03-6F, de ADN, se encontraban más estrechamente relacionadas. Anteriormente se había comprobado la tendencia de los grupos clasificados en el filo *Actinobacteria* a tener más peso en las librerías de ARN con respecto a lo observado en los análisis del ADN total.

Por muestra y librería, en EP01-6F, ADN, se identificaron las clases *Gammaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*, con el 21%, 16%, 6% y 2% de abundancia total, respectivamente. *Nitriliruptoria*, perteneciente al filo *Actinobacteria*, fue la clase más abundante del total, con un 28%. También dentro de este mismo filo se identificó con algo más del 9% a la clase *Actinobacteria*. En la librería que analizaba las bacterias metabólicamente activas de la misma muestra, al igual que lo observado en la librería de ADN, *Nitriliruptoria* fue el grupo más representativo del total identificados, mientras que dentro de las *Proteobacteria* se observó una mayor abundancia de la clase *Alphaproteobacteria* frente a *Gammaproteobacteria*, al contrario de lo observado en la librería de ADN.

La librería ADN de la muestra MZ03-6F presentó a *Gammaproteobacteria* como el grupo más abundante con un 26,4% del total de clones analizados. También dentro del filo *Proteobacteria*, las clases *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* obtuvieron una presencia destacable en la muestra, con el 12% y 6,4% de las secuencias totales, mientras que *Deltaproteobacteria* tuvo una representación testimonial, por debajo del 2% total. Por otra parte, el filo *Actinobacteria* presentó más divisiones a nivel de clase, contando con los grupos *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* y *Thermoleophilia*, con el 16%, 8%, 7,2%, 2,4% y 0,8%, respectivamente. La genoteca para el estudio de las bacterias metabólicamente activas en la muestra MZ03-6F presentó una distribución taxonómica similar a la observada en el análisis de clones del ADN total, ya que *Gammaproteobacteria* representó el 20% de la muestra total, seguido de *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, con el 11,1% y el 7,78%. *Deltaproteobacteria* apareció de forma residual.

En lo que respecta a la muestra MZ03-7G, la genoteca para el análisis del ADN total mostró a *Gammaproteobacteria* como la clase más abundante, seguida de *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Hydrogenophilalia* y *Deltaproteobacteria*, con el 31,58%, 20%, 13,68%, 3,16% y 2,1%, respectivamente. Del filo *Acidobacteria* destacó *Blastocatellia* o Subdivisión 4, con el 11,58% total, determinándose también la presencia, más reducida de la clase Subdivisión 6. En el filo *Nitrospirae* se identificó el grupo *Nitrospira*, como única clase. Para la librería de bacterias metabólicamente activas, *Gammaproteobacteria* fue el grupo más abundante dentro del filo

Proteobacteria y de la muestra total, con el 23,23% de abundancia. Dentro de este filo, le siguió muy de cerca *Alphaproteobacteria*, con el 21,21%, y con menos representatividad *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*, con el 10,1% y el 5%, respectivamente. Dentro del filo *Acidobacteria*, *Blastocatellia* se erigió como la clase más abundante con el 22,22% total. Otros grupos a nivel de clase fueron la Subdivisión 6 o *Vicinamibacter*, y *Solibacteres*, pero presentaron una abundancia residual. La clase más representativa del filo *Actinobacteria* fue *Acidimicrobiia*, con el 8,1%, donde también se observó la clase *Rubrobacteria*, contando con un 2% del total. *Nitrospira*, *Clostridia* y *Vampirovibrio*, fueron los grupos a nivel de clase identificados en los filos *Nitrospirae*, *Firmicutes* y *Cyanobacteria*, respectivamente.

Lo observado en las genotecas de las distintas muestras sigue una dinámica muy semejante a los resultados obtenidos por Riquelme y colaboradores (2015a), donde las clases *Gamma-* y *Alphaproteobacteria* presentaron elevados porcentajes de abundancia en la muestra, siendo los grupos más representativos del filo *Proteobacteria*, a excepción de la genoteca de ADN de MZ03-7G, donde *Betaproteobacteria* tuvo más representación que *Alphaproteobacteria*.

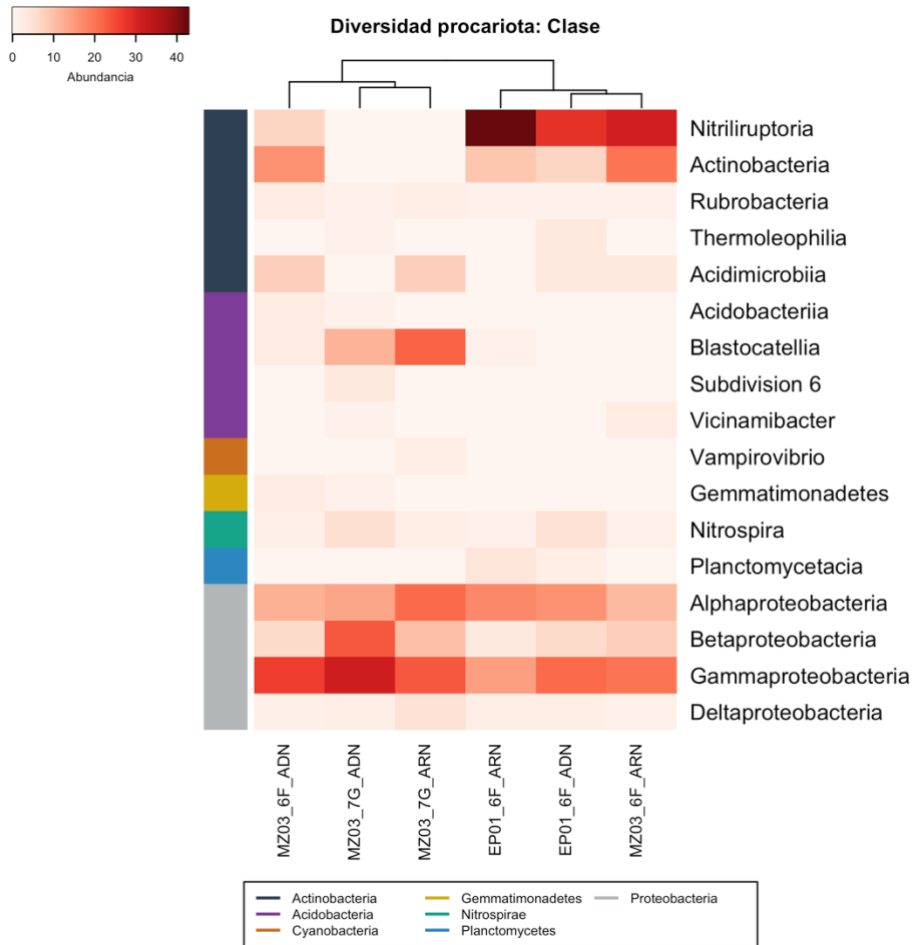


Figura 3.2. Mapa de calor relacionando las distintas librerías de las muestras analizadas por clonación. Análisis taxonómico a nivel de clase (columna de la derecha). La columna de la izquierda agrupa cada clase con el filo que le corresponde (leyenda en zona inferior de la figura).

3.1.3.3 MAPA DE CALOR A NIVEL DE ORDEN

A nivel de orden (Fig. 3.3), de nuevo se volvió a observar el mismo escenario generado a nivel de filo, ya que la distribución de los grupos más representativos volvió a relacionar de forma más estrecha ambas librerías de cada muestra, presentando una mayor cercanía entre las muestras EP01-6F y MZ03-6F. Los grupos a nivel de orden de las clases *Alpha*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria* y su abundancia en las genotecas, así como la abundancia observada para el grupo *Blastocatellales*, de la clase *Blastocatellia*, fueron los detonantes de las posiciones observadas en el dendrograma. Mientras que la tendencia de *Chromatiales* y *Rhizobiales*

parece ser ciertamente uniforme en las diferentes muestras, la distribución de *Euzebyales* y *Pseudonocardiales*, por un lado, y la correspondiente a *Blastocatellales* y *Burkholderiales*, por otro, favorecieron la diferenciación de las ramas en el dendrograma.

El orden más abundante de EP01-6F, ADN, fue *Euzebyales*, el único grupo de la clase *Nitriliruptoria*, por lo que se obtuvo el mismo porcentaje de abundancia. Los siguientes grupos importantes en la genoteca fueron *Chromatiales*, incluido en la clase *Gammaproteobacteria*, y *Rhizobiales*, en *Alphaproteobacteria*, con un 20% y 12% de la representación total de la muestra. El resto de grupos aparecieron con una abundancia por debajo del 5% total. En lo que respecta a la librería de ARN, de nuevo *Euzebyales* presentó los mismos valores que la clase donde se ubica filogenéticamente, así como sucedió con *Frankiales* de la clase *Actinobacteria*. *Rhizobiales* y *Chromatiales* también obtuvieron unos índices de representatividad significativos, con un 12,24% y 10,2%, respectivamente.

En MZ03-6F, ADN, la clase *Gammaproteobacteria* se conformó por dos grupos a nivel de orden, *Chromatiales* y *Steroidobacter*, con un 17,6% y un 8,8%, respectivamente, del total de secuencias analizadas en esta librería. Dentro de *Alphaproteobacteria* destacó el grupo *Rhizobiales*, con el 7,2% de representación total, mientras que para *Betaproteobacteria*, *Burkholderiales* obtuvo un 5,6% de abundancia. Los grupos a nivel de orden más abundantes agrupados en el filo *Actinobacteria* fueron *Pseudonocardiales*, con el 15,2%, seguido por *Acidimicrobiales* y *Euzebyales*, con el 7,2% cada grupo. Los resultados obtenidos en la librería de bacterias metabólicamente activas de MZ03-6F alteraron la distribución de la comunidad bacteriana presentada por la genoteca de ADN total. En el caso de *Gammaproteobacteria*, el orden *Steroidobacter* alcanzó algo más del 11% de la muestra total, mientras que *Chromatiales* obtuvo algo más del 5% de abundancia. En *Alpha*- y *Betaproteobacteria* sí se siguió una distribución de las comunidades similar al observado en la librería de ADN total ya que *Rhizobiales* y *Burkholderiales* presentaron una abundancia de algo más del 6,6%, cada uno. El resto de grupos a nivel de orden no presentaron una abundancia destacable en la muestra, no alcanzando en ningún caso el 5% de representación total.

En la genoteca de ADN total de MZ03-7G la distribución de grupos a nivel de orden fue muy similar a la observada en la librería de MZ03-6F ADN.

Así *Chromatiales*, *Burkholderiales* y *Rhizobiales*, con 30,52%, 14,73% y 11,58%, respectivamente, fueron los grupos más abundantes. Del filo *Acidobacteria* destacó *Blastocatellia* con el 11,58% total, con *Blastocatellales* como único orden en esta clase. De forma más residual, se determinó la presencia de la clase Subdivisión 6 de *Acidobacteria* que contenía el orden *Vicinamibacteraceae*. Dentro de *Nitrospira* se identificaron los grupos *Nitrospirales* y *Methyloirabilis*, con niveles de representación no relevantes. En el análisis de las bacterias metabólicamente activas, *Pseudomonadales* y *Steroidobacter* fueron los grupos identificados dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, con el 15,15% y 8,1% total, respectivamente. *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* y *Caulobacterales*, con el 15,15%, 4% y 2%, respectivamente, se identificaron dentro de *Alphaproteobacteria*. *Burkholderiales* monopolizó la representación a nivel de orden para la clase *Betaproteobacteria* con un 10,1% de la muestra total. Las acidobacterias presentaron una importante abundancia del grupo *Blastocatellales*, con el 21,1% del total, observándose el grupo *Vicinamibacter* clasificado dentro de la clase Subdivisión 6. *Acidimicrobiales*, con el 6,1% total, fueron el grupo a nivel de orden más abundante dentro del filo *Actinobacteria*, donde también apareció *Gaiellales* dentro de la clase *Rubrobacteria*.

Chromatiales apareció en las tres muestras analizadas, con mayor o menor abundancia, en ambas librerías de ADN y ARN, a excepción de la genoteca de bacterias metabólicamente activas de MZ03-7G, donde no se identificó ningún OTU en este orden. La relación de pigmentación de las comunidades estudiadas podría seguir parcialmente el patrón sugerido por Porca y colaboradores (2012) con la presencia de *Pseudonocardiales*, *Chromatiales* y *Xanthomonadales* como los causantes de la coloración amarilla, ya que MZ03-6F presentaba a los tres grupos y EP01-6F, solo el segundo orden. Además, la ausencia de *Chromatiales* en la genoteca de ARN de MZ03-7G, cuya coloración de las colonias es blanca, podría reforzar esta hipótesis. Sin embargo, las muestras de donde procedían las secuencias de bacterias no cultivables más cercanas a las secuencias de OTUs analizados en la presente tesis, presentaban diferentes coloraciones, también para los OTUs más abundantes, los cuales debería de llevar el peso fenotípico de la comunidad bacteriana.

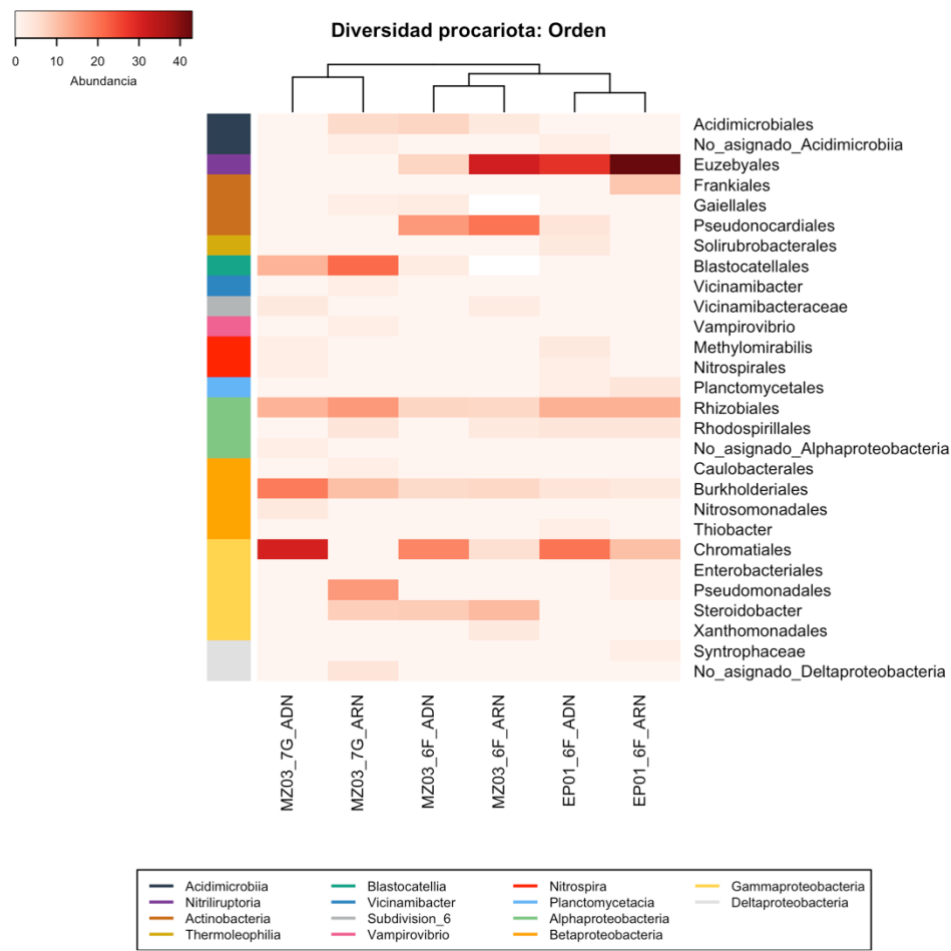


Figura 3.3. Mapa de calor relacionando las distintas librerías de las muestras analizadas por clonación. Análisis taxonómico a nivel de orden (columna de la derecha). La columna de la izquierda agrupa cada orden con la clase que le corresponde (leyenda en zona inferior de la figura).

3.1.3.4 MAPA DE CALOR A NIVEL DE GÉNERO

Por último, a nivel de género (Fig. 3.4), se volvió a presentar un escenario similar al observado a nivel de clase, generándose dos ramas diferenciadas en el dendrograma. Si bien los grupos del filo *Actinobacteria* vuelven a ser el factor determinante, en esta ocasión se da una relación más estrecha entre las librerías de la muestra EP01-6F, por un lado, y entre las genotecas de ADN total de las muestras MZ03-6F y MZ03-7G, por el otro. También se pudo observar la diferenciación entre las dos librerías de MZ03-6F, ya que la abundancia del género *Euzebya* en la genoteca de ARN situaría a

esta en la rama más próxima a las librerías de EP01-6F. Sin embargo, la librería MZ03-6F, ADN, presentó una mayor proximidad con las librerías de MZ03-7G debido a un mayor peso específico de los grupos del filo *Proteobacteria*, como los géneros *Thiohalomonas*, *Thioalkalivibrio* y *Poalibacter*.

Euzebya se presentó como el género más abundante de la genoteca de ADN total de EP01-6F, con el 28%, el mismo porcentaje para el orden y la clase donde se clasificó este grupo de actinobacterias. *Methylocapsa* y *Methyloceanibacter*, de *Rhizobiales*, presentaron abundancias superiores al 5% total. Dentro de *Chromatiales*, *Halochromatium* y *Thioalkalivibrio* mostraron una representación significativa, con un 10% y 7%, respectivamente. La genoteca de ARN EP01-6F mostró que a nivel de género *Euzebya* fue el grupo más abundante en el presente estudio, con un 42% del total de clones clasificados. También agrupado en el filo *Actinobacteria*, el género *Frankia* presentó algo más de un 7% de la muestra total, por debajo de géneros *Methylocapsa* y *Thioalkalivibrio*, con el 8 y el 9%, incluidos en la clase *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, respectivamente.

Las genotecas de MZ03-6F presentaron a *Thiohalomonas* y *Poalibacter* como los géneros más representativos en la librería de ADN con el 12% y el 8%, respectivamente. Ambos clasificados en la misma clase, *Gammaproteobacteria*, se clasificaron en diferentes órdenes. El resto de géneros se mantuvieron por debajo del 5% de abundancia. *Streptoalloteichus* se presentó como el grupo más abundante de las actinobacterias en esta librería, con el 14,4% total. Por detrás se situaron *Pseudonocardia* y *Euzebya*, con el 7,2%. No obstante, el escenario cambió si se atendía a la librería de ARN de la muestra, ya que *Streptoalloteichus* desapareció y aumentó *Pseudonocardia* con un 17,18% de la muestra total. Además, *Euzebya* se erigió como grupo a nivel de género más abundante con el 31,11% del total. De las proteobacterias destacó *Poalibacter*, con un 10% del total.

En el caso de la genoteca de ADN de la muestra MZ03-7G, *Endothiovibrio* y *Thiohalomonas* fueron los grupos más abundantes en *Chromatiales* con el 17,89% y el 6,32%, mientras que en *Burkholderiales*, *Piscinibacterium* presentó un 10,53% de abundancia de la muestra total. Se clasificaron como “No asignado” una elevada proporción de grupos a nivel de género, especialmente en las acidobacterias, por no alcanzar el mínimo del

90% de similitud con las secuencias más próximas en la base de datos cultivable. Igualmente, la librería de ARN clasificó a un elevado número de secuencias como “No asignado”. *Permianibacter* con el 12,12% fue el género más representativo, seguido de *Povalibacter* con un 8%.

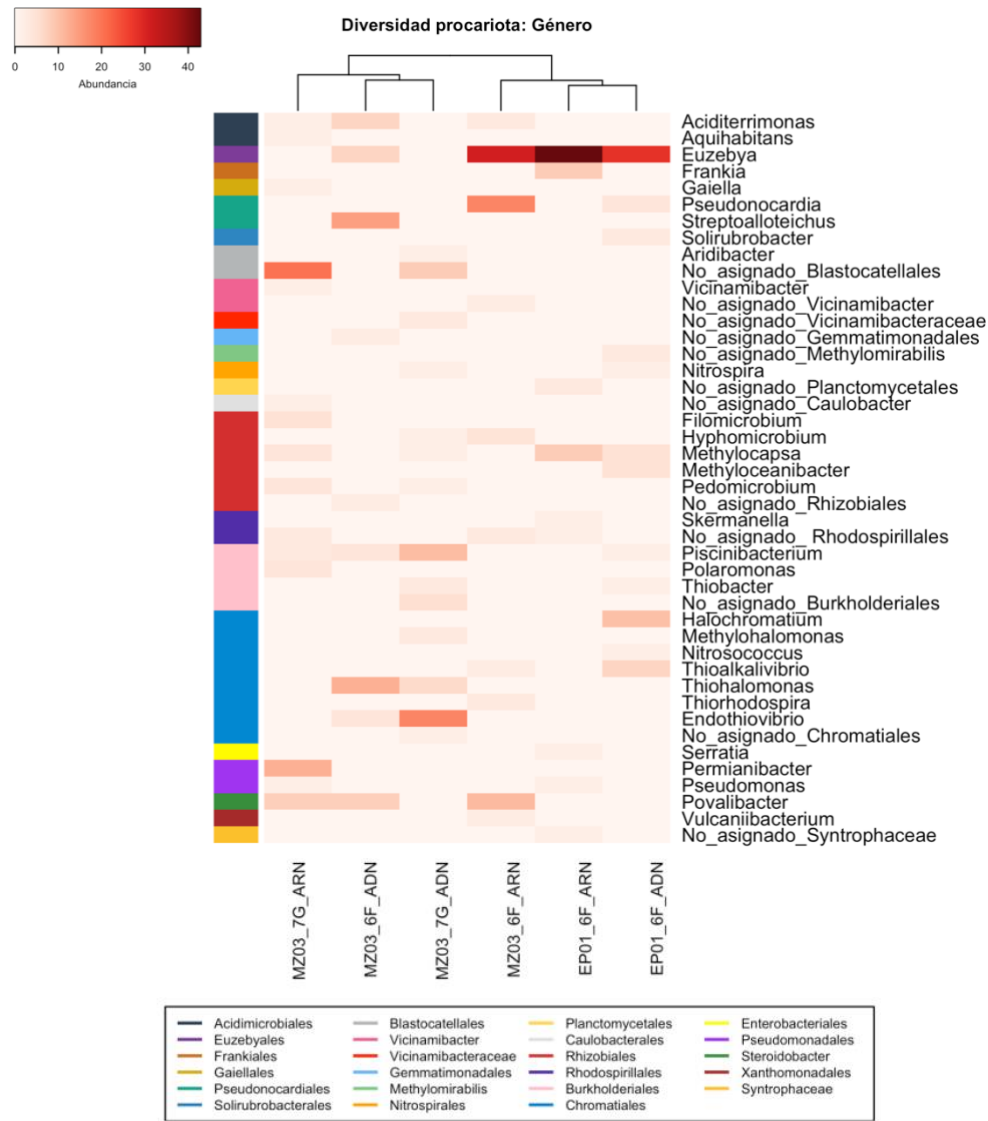


Figura 3.4. Mapa de calor relacionando las distintas librerías de las muestras analizadas por clonación. Análisis taxonómico a nivel de género (columna de la derecha). La columna de la izquierda agrupa cada Género con el orden que le corresponde (leyenda en zona inferior de la figura).

En definitiva, las diferencias son más notables a mayor especificación del nivel taxonómico de los OTUs de cada librería. Los patrones a nivel de filo no cambiaron sustancialmente entre ambas genotecas de la misma muestra, sin embargo, sí se apreció una abundancia variable entre ellas, así como una reducción de la diversidad en los análisis de bacterias metabólicamente activas con respecto al ADN total. Esto pudo deberse a varios condicionantes, tanto ambientales o naturales, como técnicos. Los factores ambientales englobarían el transporte del ADN desde la superficie vía lixiviados, latencia de microorganismos en un momento inadecuado para su desarrollo y la presencia del ADN de células de bacterias muertas (Culver y Pipan, 2009). Los factores técnicos son aquellos que suceden mediante el procesado de los ácidos nucleicos. El estudio del ARN provee un estudio más preciso de las comunidades microbianas en la muestra (Mengoni y col., 2005), sin embargo, el ADN es más resistente que el ARN, el cual tiene una duración de unos pocos minutos en condiciones normales. A modo de ejemplo, algunos estudios midieron la vida media del ARN para las cepas modelo *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, comprobando que si bien para *E. coli* la viabilidad del ARN se perdía pasados los 5 minutos, en el caso de *B. subtilis* la vida media podía sobrepasar los 15 minutos (Hambraeus y col., 2003; Salinger y col., 2003). De este modo, la disponibilidad del ARN variará dependiendo del grupo de bacterias en la muestra, interfiriendo en los resultados finales.

Por otra parte, la distribución taxonómica observada en los distintos tubos de lava no siguió un patrón común, ya que como discutieron Hathaway y colaboradores (2014), no es el medio el que selecciona las comunidades de microorganismos que colonizan el ecosistema. Esto se soporta sobre los hechos que condicionan los resultados observados en la presente tesis doctoral. En primer lugar, se han asemejado más estrechamente las comunidades de las muestras EP01-6F y MZ03-6F, ambas tomadas de diferentes tubos de lava, especialmente la librería de ARN de la última. En este caso, ubicándose a escasa distancia las dos muestras MZ03 analizadas, ambas deberían de haber presentado una mayor coincidencia en las comunidades de bacterias identificadas. Tampoco la hipótesis de Porca y colaboradores (2012) de asignar la pigmentación amarilla a un patrón de filotipos compuesto por *Pseudonocardia*, *Chromatiales* y *Xanthomonadales* fue refrendada, puesto que ni existió la presencia de estos grupos en las dos muestras amarillas analizadas (EP01-6F y MZ03-6F), ni las coloraciones de las colonizaciones donde se aislaron las secuencias de bacterias no

cultivables fueron las que se esperaban, ya que incluso se observaron más referencias a colonias blancas que a amarillas. Aun así, no habría que descartar el papel de las actinobacterias en la coloración o pigmentación de los tapetes microbianos, tal y como indicaron Lavoie y colaboradores (2017).

Los OTUs obtuvieron un índice de clasificación elevada en los niveles taxonómicos superiores, especialmente a nivel de filo, y se fue reduciendo a niveles inferiores. Esto es algo común en los estudios de la diversidad total de muestras ambientales (Sul y col., 2011; Hathaway y col., 2014; Riquelme y col., 2015a) y se debe al porcentaje de similitud que se obtenga del análisis taxonómico con las secuencias en las bases de datos, a mayor porcentaje, mayor identificación filogenética de la secuencia problema. La mayoría de los microorganismos del planeta no han podido ser identificados hasta el momento debido a la dificultad de extrapolar las condiciones ambientales donde se desarrollan los microbios al laboratorio (Stewart, 2012). Por lo tanto, la disponibilidad de secuencias en las bases de datos con las que comparar está sesgada por este hecho.

3.2 CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA O HT-NGS

El estudio de las comunidades bacterianas mediante técnicas de secuenciación masiva a través de marcadores genéticos se llevó a cabo en una segunda fase en la tesis doctoral, desde principios de 2017 hasta finales de 2018, utilizando muestras de la campaña 2016. No se realizó estudio de las comunidades metabólicamente activas utilizando esta tecnología.

La secuenciación del ADN total se realizó utilizando la plataforma de NGS Illumina mediante secuenciador MiSeq, basándose en la amplificación de las regiones V3-V4 del gen ARNr 16S. Las plataformas de Illumina se han erigido como la mejor elección en relación a tasas de error, profundidad de la secuenciación y coste por base, llegando a ser la tecnología más utilizada (Glenn, 2011; Buermans y den Dunnen, 2014; Greenleaf y Sidow, 2014). La selección de la o las regiones a secuenciar ha sido motivo de discusión y

estudio en los últimos años a raíz de la aparición de las tecnologías de secuenciación masiva (Claesson y col., 2010; Tremblay y col., 2015; Clooney y col., 2016; Martínez-Porchas y col., 2016). La secuenciación de la región V3-V4 genera fragmentos o amplicones más extensos (430 pares de bases, aproximadamente) y reproduce un menor porcentaje de error que en otras regiones (Kozich y col., 2013).

Se analizaron muestras de los tubos de lava “Fuente de la Canaria” (MZ03-X), “Búcara II de Montes Luna” (MZ26-X) y “Cueva honda del Bejenado” (EP01-6F). En la “Fuente de la Canaria”, MZ03-10J, se caracterizó por presentar una apariencia similar a MZ03-7G, descrita en el apartado de clonación, con formaciones de colonia blancas sobre un gel sobre roca de lava. MZ03-9I fue una muestra tomada de una zona de influencia de moonmilk. MZ03-8H presentó depósitos de biofilm de color marrón-naranja sobre una brecha en el tubo de lava a través del cual se filtraba agua de escorrentía. MZ03-2B presentó depósitos de colonias de color marrón. MZ03-3C se caracterizó por formaciones de mucolitos color crema-caramelo. Las muestras de la “Búcara II de Montes Luna” estaban caracterizadas por la formación de moonmilk en fases de desarrollo aparentemente diferentes. MZ26-11K fue tomada de una formación color rosa con zonas intermitentes de moonmilk, mientras que MZ26-12L era una muestra de moonmilk consolidado.

Inicialmente, se secuenciaron tres muestras para generar lecturas de 300 pares de base en sentidos *forward* y *reverse* o también llamado *paired end* (PE). Por último, se secuenciaron el resto de muestras para la generación de lecturas de 250 pares de bases PE (Tabla 3.9). Debido a las exigencias de calidad y concentración del ADN por parte de la empresa de secuenciación, la muestra MZ03-6F, anteriormente estudiada haciendo uso de técnicas de cultivo y clonación, no pudo ser estudiada empleando técnicas de secuenciación masiva.

Los datos o lecturas crudas obtenidos del secuenciador fueron sometidas a un análisis de calidad y filtrado, para lo cual se utilizaron las herramientas bioinformáticas FASTQC y Trimmomatic, respectivamente.

Se apreció una destacable deficiencia en los valores de calidad de las lecturas de 300 pares de bases de longitud con respecto a las generadas de 250 pares de bases (Fig. 3.5). Por ello, el filtrado de lecturas según el índice

de calidad fue más estricto en el primer caso, reduciéndose entre el 18,98% y el 14,82% las lecturas que no pasaron el cribado (Tabla 3.9). El umbral mínimo de 150 pares de bases configurado durante la fase de filtrado buscó descartar aquellas lecturas que no pudieran tener una significación taxonómica (Hao y Chen, 2012) en el caso de no producirse el ensamblado entre lecturas generadas a través del mismo fragmento de ADN, pero distinto sentido. Por el contrario, el filtrado realizado sobre los datos crudos de 250 pares de bases fue muy leve, debido a la buena calidad de las lecturas de origen, eliminándose menos de un 2% de las lecturas totales en cada muestra. De esta forma parece ser más fiable la configuración de secuenciación que genera lecturas 250 pares de bases frente a aquella que genera 300.

Parece ser que las causas de este descenso en la calidad de las lecturas y, por tanto, un peor procesado y resultado final, tiene que ver con la configuración de ciclos aplicada para en los kits de secuenciación de Illumina (Schloss, 2014). Estos ciclos forman parte del proceso post-amplificación que se da en la fase de secuenciación del ADN en las plataformas Illumina, denominado “*terminación reversible cíclico*” o CRT. En este proceso se añaden los nucleótidos a la cadena o fragmento amplificado para generar las lecturas, cada nucleótido añadido se corresponde con un ciclo. Por lo tanto, el número de ciclos dependerá de la longitud de la lectura, en ambos sentidos del fragmento (Metzker, 2010). Para generar 300 pares de bases la empresa de secuenciación Stab Vida utilizó el “MiSeq Reagent Kit v3”, que realiza 600 ciclos para producir las lecturas, mientras que la empresa MacroGen utilizó el “MiSeq Reagent Kit v2” para generar lecturas de 250 PE, que ejecuta 500 ciclos para tal efecto. De este modo, Schloss (2014), sugiere que el descenso abrupto de la calidad las secuencias a partir de los 500 ciclos en adelante produce posteriores fallos en el ensamblado de las lecturas secuenciadas en ambos sentidos, afectando al análisis de los datos.

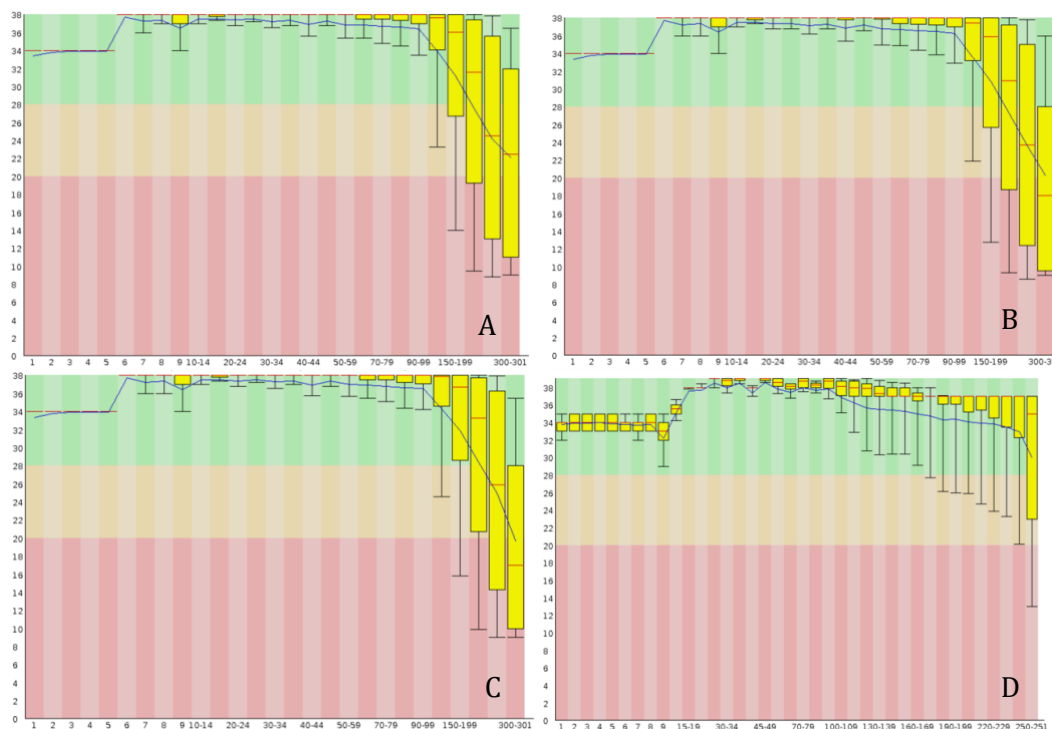


Figura 3.5. Análisis de calidad de las muestras EP01-6F (A), MZ03-7G (B), MZ03-10J (C), secuenciadas utilizando la metodología de generación de lecturas de 300 pares de base PE, y MZ03-9I (D), secuenciada para generar lecturas de 250 pares de bases PE. El eje vertical de los gráficos indica el valor de calidad Phred y el eje horizontal las pares de bases de las lecturas. Se aprecia la degeneración en la calidad en el último tramo de las lecturas de las muestras A, B y C, mientras que en D la calidad es apreciablemente mejor.

El ensamblado de lecturas que daría lugar a secuencias para su identificación y clasificación posterior con QIIME se vió igualmente limitada en aquellas muestras secuenciadas con la plataforma Illumina que producía lecturas de 300 pares de bases, ya que el software PEAR, utilizado para tal efecto, no consiguió ensamblar entre el 40,93% y el 45,78% de las lecturas. Las lecturas ensambladas y no ensambladas de cada muestra fueron fusionadas en un mismo archivo.

El siguiente paso consistió en adecuar las secuencias del conjunto de muestras para su análisis con QIIME. Para ello el comando “multiple_split_libraries_fastq.py”, incluido en dicho software, tomó los ficheros que contenían las secuencias en formato *fastq* de cada muestra y realizó un cribado de estas, eliminando aquellas que presentaran indeterminaciones (N's) o que no pasaran el filtro de calidad considerado por

QIIME. Estas secuencias fueron incluidas en un único fichero, denominado *seqs.fna*, que fue el utilizado para buscar y eliminar secuencias quiméricas.

La detección y eliminación de quimeras se realiza con los comandos, también incluidos en QIIME, “*identify_chimeric_seqs.py*” y “*filter_fastq.py*”, respectivamente, y es el último paso previo análisis de identificación taxonómica y de abundancia de las comunidades procariotas. El filtrado de lecturas y secuencias por calidad de estas, así como el resultado obtenido tras la eliminación de quimeras se presentan en la Tabla 3.9. Se puede observar una acusante variación de los datos útiles entre las metodologías de secuenciación de 250 y 300 pares de bases. Mientras que para las muestras secuenciadas en el primer caso se han descartado entre el 35,45% y el 20,04% de los datos generados, en el caso de la generación de lecturas de 300 pares de bases el cribado de datos ha variado entre el 80,49% y el 37,07% del total.

Muestra	Longitud de lecturas	Lecturas crudas	Lecturas filtradas (Trimmomatic)	Cribado QIIME (seqs.fna)	Secuencias sin quimeras
MZ03-7G	300 pares de bases PE	255952	207378	110967	49927
MZ03-10J	300 pares de bases PE	263935	224809	131247	97835
MZ03-8H	250 pares de bases PE	803067	794285	793966	560037
MZ03-3C	250 pares de bases PE	901435	894325	894092	691452
MZ03-9I	250 pares de bases PE	587053	583004	582423	402834
MZ03-2B	250 pares de bases PE	615191	608410	608132	397119
MZ26-11K	250 pares de bases PE	818726	811783	811499	655205
MZ26-12L	250 pares de bases PE	870719	859347	859056	696209
EP01-6F	300 pares de bases PE	274990	228733	131136	86678

Tabla 3.9 Filtrado de datos crudos previo análisis taxonómico y de biodiversidad de las distintas muestras estudiadas.

3.2.1 ANÁLISIS TAXONÓMICO DE LAS GENOTECAS HT-NGS

El estudio de diversidad mediante la construcción de bibliotecas basadas en marcadores empleando técnicas de NGS llevado a cabo con QIIME favoreció la identificación y clasificación de los microorganismos procariotas hasta nivel de género. Para lo cual, se utilizó la base de datos actualizada de SILVA (noviembre de 2017).

Los resultados incluidos en la presente tesis se representan a través de mapas de calor con aquellos grupos de diferente nivel taxonómico con una abundancia igual o superior al 1% en cualquiera de las muestras analizadas. Los grupos que alcanzan la identificación de “Uncultured” (No cultivados) no se ven representados en niveles taxonómicos inferiores debido a que dicha clasificación supone el taxón mínimo que se ha podido alcanzar a través de técnicas moleculares para la bacteria identificada.

3.2.1.1 ANÁLISIS TAXONÓMICO A NIVEL DE FILO

Los resultados sitúan a los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria* como los grupos más representativos (Fig. 3.6), presentando variaciones en la abundancia de cada grupo dependiendo de la muestra analizada. De este modo, las muestras tomadas del tubo de lava “Fuente de la Canaria” MZ03-3C, MZ03-9I, MZ03-7G y MZ03-10J, y la muestra EP01-6F, de la “Cueva Honda del Bejenado”, presentaron una abundancia del filo *Proteobacteria* que sobrepasaron el 50% de la representación total de cada muestra, con el 53,3%, 56,2%, 50,9%, 89,6% y 51,3%, respectivamente. Las muestras MZ03-2B y MZ03-8H, y las muestras tomadas del tubo de lava “Búcara II de Montes Luna”, MZ26-11K y MZ26-12L, presentaron índices inferiores, aunque también representó el grupo más abundante con el 37,6% y 40,1% para las dos primeras muestras, respectivamente, mientras que para las dos últimas este grupo presentó los valores más bajos de toda la serie de muestras analizadas, posicionándose en segunda posición en representatividad, con el 20,3 % y 17,4%, respetivamente.

En cambio, es el filo *Actinobacteria* el que presentó mayores índices de abundancia para estas dos muestras, que se correspondían con formaciones de moonmilk en diferentes fases de desarrollo, obteniendo un 56,8% y 60,3% total, respectivamente. Para el resto de muestras, este grupo taxonómico alcanzó una representación fundamental en la comunidad procariota, pero siempre obteniendo valores algo más inferiores a los obtenidos por el filo *Proteobacteria*, como es el caso de EP01-6F, con un 42,1% de la abundancia total, muy inferiores, como los casos de las muestras MZ03-3C, MZ03-9I, MZ03-7G, MZ03-8H y MZ03-2B, con el 20,4%, 18,8%, 16,9%, 14,3% y 13,2%, respectivamente, o prácticamente despreciables en el caso de MZ03-10J, con un 3,4% de la abundancia total de la muestra.

Acidobacteria se presentó como el tercer filo en importancia por lo general. En todas las muestras obtiene índices de representatividad superiores al 1%, especialmente en MZ03-2B y MZ03-8H, con un 12,6% y un 12,3% del total. De nuevo se volvió a comprobar la relación inversa en la abundancia entre los filos *Acidobacteria* y *Actinobacteria* observada en las genotecas de clones, ya que se observaron mayores índices de este filo en aquellas muestras donde el primero posee una representatividad menor, lo que se pudo determinar tanto en las dos muestras anteriores, como en MZ03-3C, MZ03-9I y MZ03-7G, presentando un 7.7%, 6.8% y 7,9% de la abundancia total, respectivamente. Igualmente, las actinobacterias parecieron limitar el desarrollo de comunidades de otros grupos como es el caso de *Nitrospirae*, ya que, a excepción de MZ03-10J donde *Proteobacteria* pareció monopolizar la colonización bacteriana en dicha zona de muestreo, se observó un papel importante de este grupo en aquellas muestras con porcentajes de *Actinobacteria* más reducidos, presentando índices que se situaron entre el 5,4% y el 12,5%, para MZ03-9I y MZ03-2B, respectivamente. Tampoco pareció haber una diversidad muy homogénea en EP01-6F, puesto que más del 93% de las comunidades representativas se repartieron entre *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

Chloroflexi pareció tener una representación relativamente importante en las muestras MZ26-11k y MZ26-12L, con un 6,1% y 8,1%, cuyo desarrollo pudo estar influenciado por las características físico-químicas del sustrato donde se asienta, ya que no se apreció una relación de representatividad entre este grupo y otros presentes en las distintas muestras. *Gemmatimonadetes* y *Planctomycetes* presentaron valores de abundancia reducidos en las muestras, a excepción de MZ03-10J, MZ03-9I y EP01-6F, donde su representatividad fue prácticamente despreciable. Por último, los filos *Bacteroidetes*, GAL15, *Gemmatimonadetes*, *Ignavibacteriae*, *Parcubacteria*, SBR1093 y *Verrucomicrobia*, se presentaron con índices de abundancia muy bajos o casi residuales, según la muestra analizada. La representatividad de arqueas fue prácticamente nula en todas las muestras estudiadas.

La aplicación de técnicas moleculares para obtener secuencias del gen ARNr 16S del medio ambiente comenzó a utilizarse a finales del siglo XX para identificar nuevos grupos taxonómicos que no podían ser cultivados hasta el momento, pero que presentaban las evidencias necesarias para considerarlos

como tal (Hugenholtz y col., 1998). Posteriormente se fue evolucionando a través del uso de la Hibridación de Fluorescencia *in situ* o FISH (Hugenholtz y col., 2001) para utilizar a día de hoy las nuevas tecnologías de NGS (Guermaz y col., 2008; Glöckner y col., 2010). Estos nuevos linajes procariotas son reconocidos como “Candidatos” hasta el momento en el que finalmente hayan podido ser cultivados. Gracias a estas aportaciones, las bases de datos comenzaron a incluir nuevas secuencias pertenecientes a estos nuevos linajes que han permitido identificar en la presente tesis doctoral a los grupos candidatos GAL15, Parcubacteria y SBR1093. GAL15 fue originalmente descubierto en sistemas geotérmicos de Yellowstone, asociado a procesos de óxido-reducción de hierro y arsénico (Ackerman, 2006) y posteriormente localizado en sedimentos óxicos subterráneos (Lin y col., 2012). Parcubacteria, inicialmente denominado OD1, ha sido identificado en ambientes reducidos con presencia de compuestos de azufre, como el sulfato y el sulfuro en ambientes marinos o acuíferos (Harris y col., 2004; Rinke y col., 2013). SBR1093 forma parte de la división TM7, y fue identificado originalmente a través de muestras de lodos activos utilizados para eliminar fosfatos (Hugenholtz y col., 2001). Tanto GAL15 como SBR1093 ha sido identificado en cuevas kársticas en muestras de moonmilk analizadas con HT-NGS (Maciejewska y col., 2018).

Ignavibacteriae, un filo de reciente descubrimiento, agrupa microorganismos quimiorganotrofo termófilo cuya presencia en ambientes subterráneos ha sido recientemente documentada (Kadnikov y col., 2017 y 2018)

El dendrograma generado en el mapa de calor interpreta la proximidad entre muestras mediante la representatividad de los grupos taxonómicos identificados. De esta forma se comprobó que las obtenidas del tubo de lava “Búcara II de Montes Luna” tenían una relación directa, no así en la totalidad de muestras correspondientes con la “Fuente de la Canaria” donde el estudio de diversidad de procariotas de MZ03-10J, separada de las muestras del mismo tubo de lava a través de la apertura desde la cual se accede a la cavidad, la aleja de la tendencia observada en estas. Es más, EP01-6F, localizándose en un tubo de lava a kilómetros de distancia, tuvo una distribución de filos y una abundancia más estrecha con el resto de muestras MZ03.

En comparación con los resultados obtenidos implementando la técnica de clonación, la muestra EP01-6F mostró una aproximación muy cercana en ambas tecnologías utilizadas, si se atiende a la librería de clones para el estudio del ADN total. En MZ03-7G aparecieron muchas semejanzas, situando al filo *Proteobacteria* como el grupo más abundante. Sin embargo, en aquellos grupos con relevancia secundaria, la genoteca construida con la tecnología HT-NGS presentó a *Actinobacteria* como segundo filo más abundante, relegando a *Acidobacteria* a un papel menos destacado, ya que incluso *Nitrospirae* obtuvo mayor representatividad. Mediante la clonación, *Acidobacteria* fue el segundo grupo más abundante y *Actinobacteria* no presentó abundancia destacable. Estas variaciones pueden deberse a varios factores que afectan a los resultados dependiendo de la metodología aplicada. En este punto, la abundancia de las comunidades estudiadas se pudo ver afectada por la diferente robustez de las células para ser lisadas, el contenido GC, los cebadores elegidos para la amplificación o la plataforma de secuenciación utilizada (Fouhy y col., 2016; Li y col, 2017).

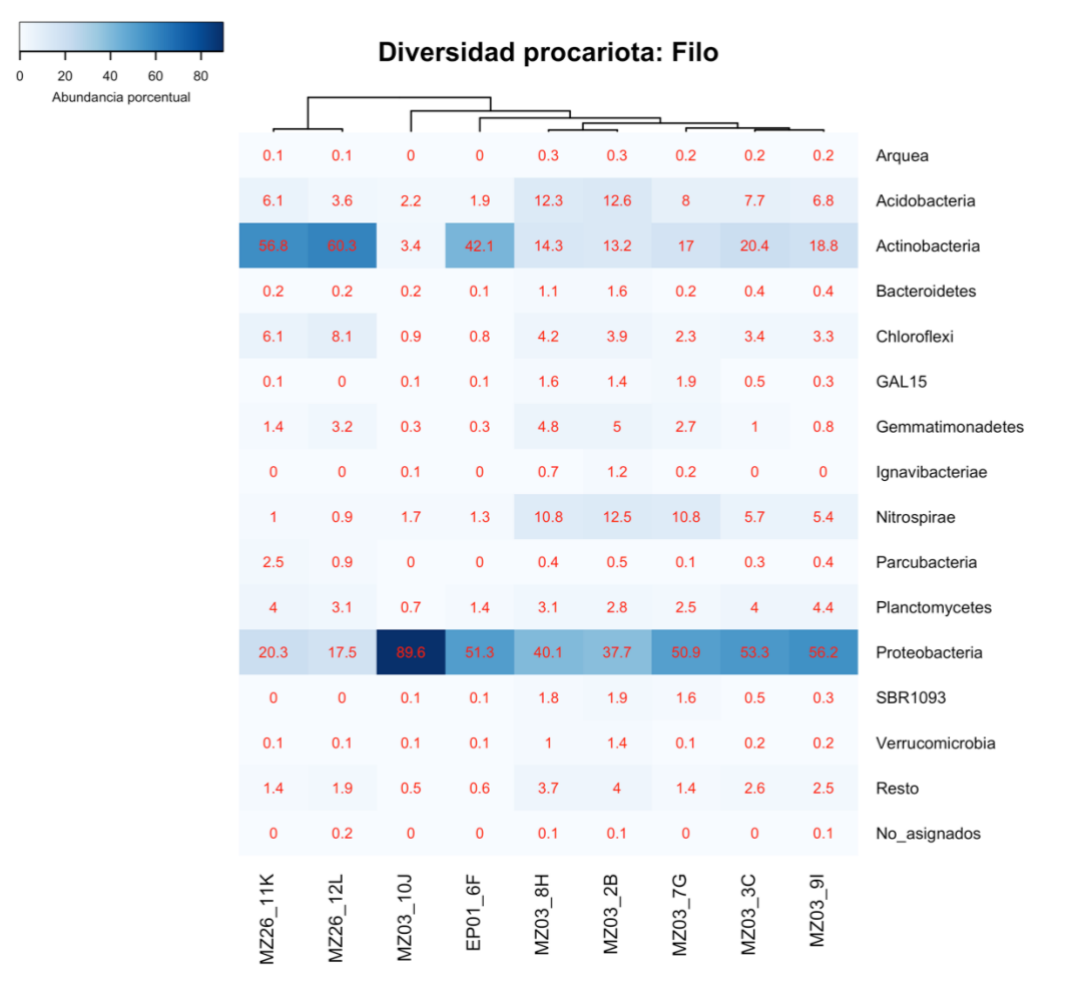


Figura 3.6. Mapa de calor del análisis de secuenciación masiva para el estudio taxonómico y abundancia para grupos a nivel de filo con una representatividad superior al 1% en, al menos, una muestra analizada. A la derecha de la imagen se describe la taxonomía de las secuencias analizadas y en la zona central el cuerpo del mapa de calor describe los porcentajes de abundancia en la muestra y en el margen izquierdo se ubica la barra de colores que relaciona a los grupos a nivel de género con los grupos a nivel de clase donde se incluyen. En el margen inferior se indican las muestras analizadas y la leyenda con los grupos a nivel de clase y la relación de estos con los colores de la barra del margen izquierdo. En el margen superior de la imagen se ubica el dendrograma o árbol que relaciona a las muestras según la distribución y representatividad de los grupos identificados a nivel de orden.

3.2.1.2 ANÁLISIS TAXONÓMICO A NIVEL DE CLASE

A nivel de clase la comunidad bacteriana comenzó a diversificarse (Fig. 3.7). Si bien *Acidobacteria* se vio representado por los grupos *Acidobacteria*, *Blastocatellia*, *Holophagae*, y los Subgrupos 2, 6 y 17, la abundancia de estos apareció distribuida de forma bastante homogénea, y

ninguno alcanzó el 5% total. No fue el caso de los grupos clasificados dentro de los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. En ambos grupos se identificaron una amplia diversidad, pero con abundancia dispar dependiendo de la muestra analizada. Así, en *Actinobacteria*, los grupos *Actinobacteria* y *Acidimicrobiia* se presentaron como los taxones más abundantes, especialmente el primero. Este es principalmente representativo en MZ26-11K y MZ26-12L, también en MZ03-9I, MZ03-3C y MZ03-7G, y en menor medida en MZ03-2B y MZ03-8H. Por el contrario, la clase *Nitriliruptoria* casi monopolizó la representación de actinobacterias en EP01-6F, siendo inexistente o prácticamente despreciable su presencia en el resto de muestras, a excepción de MZ26-12L, con un 11,2% de la abundancia total.

Se han identificado cinco grupos a nivel de clase dentro del filo *Proteobacteria*, y al igual que con el filo *Actinobacteria*, la representación de los distintos grupos en las muestras fue bastante variable. El candidato SPOTSOCT00m83 se presentó como la clase más abundante en las muestras MZ03-10J, EP01-6F y MZ03-7G con el 68%, 26,2% y 13,7% total, respectivamente, teniendo un papel secundario en MZ03-3C y MZ03-9I, con el 14,6% y 15,8%, respectivamente. En el resto de muestras presentó valores por debajo del 8% (MZ26-11K), lo cual no lo situó en una posición muy destacable dentro de la comunidad bacteriana. *Gammaproteobacteria* se presentó como grupo más abundante en las muestras MZ03-9I y MZ03-3C, con un 22,9% y 21,3%, respectivamente. Con valores por encima del 10%, pero con un papel secundario dentro de la comunidad de proteobacterias, apareció en MZ03-8H, MZ03-7G, MZ03-10J y EP01-6F. *Betaproteobacteria* fue la clase más abundante en MZ03-2B y MZ03-8H, con el 18,7% y 13,2%. En MZ03-7G también tuvo una representación destacable con el 11,7%, estando por debajo del 5% en el resto de muestras. *Alphaproteobacteria* presentó valores significativos en MZ03-7G, MZ03-3C y MZ03-9I, con el 12,6%, 10,6% y 10,8%, respectivamente, obteniendo valores por debajo del 8% en el resto de muestras. Por último, *Deltaproteobacteria* presentó valores de baja representatividad o casi despreciables.

El candidato SPOTSOCT00m83 es una bacteria sulfo-oxidante que se identificó en zonas de influencia de un acuífero kárstico y en sedimentos marinos (Leach y col., 2012; Schneider y col., 2015; Bienhold y col., 2016). Así pues, debido a la elevada abundancia de este grupo en una amplia variedad

de muestras, la implicación de estos microorganismos en los procesos involucrados en el ciclo del azufre podría ser crucial.

Las actinobacterias presentaron dos principales grupos que destacaron en distintas localizaciones. Así *Nitriliruptoria* se situó como la clase más abundante de EP01-6F, de forma homóloga a los resultados obtenidos en las librerías de clonación, mientras que desempeñó un papel secundario en la muestra MZ26-12L, del tubo de lava “Búcara II de Montes Luna”. La clase *Actinobacteria*, sin embargo, tuvo un papel determinante en las muestras de moonmilk de MZ26, así como en muestras de MZ03, no así en MZ03-10J. Maciejewska y colaboradores (2017) evaluaron el papel de bacterias de la clase *Actinobacteria* en las formaciones de moonmilk de la cueva “Grotte des Collembols”, en Bélgica. *Acidimicrobiia* apareció con valores destacables, especialmente en MZ26, a excepción de MZ03-10J y EP01-6F. Este grupo fue igualmente identificado por Maciejewska y colaboradores (2018) en formaciones de moonmilk. Se observó la presencia de grupos candidatos MB-A2-108 y TakashiAC-B11. El primero fue identificado en sedimentos marinos asociados a procesos metanogénicos (Reed y col., 2002). El segundo grupo fue originalmente identificado en formaciones nodulares de hierro en la zona de influencia de la rizosfera (Yoshida y col., 2008).

Nitrospira monopolizó el grupo a nivel de clase dentro de *Nitrospirae*, presentando los mismos valores observados a nivel de filo. Presentó valores importantes en aquellas muestras más diversas, donde ningún grupo alcanzaba el 20% de abundancia total en la muestra. Esto sucedió igualmente con los grupos *Ignavibacteria*, dentro de *Ignavibacteriae*, *Gemmatimonadetes*, del filo con el mismo nombre y lo que se denominó “bacteria no cultivable” en GAL15 y SBR1093, a nivel de clase. Otros grupos con muy baja abundancia se identificaron en los filos *Planctomycetes* y *Chloroflexi*, como son *Phycisphaerae* y *Planctomycetacia*, y *Anaerolineae*, Gitt-GS-136 y *Thermomicrobia*, respectivamente, con valores que no superaron el 1% de abundancia en la mayor parte de los casos. El candidato Gitt-GS-136 fue identificado en rizosferas y muestras de guano de murciélago en cuevas (Zhang y col., 2013; De Mandal y col., 2015b).

Toda esta distribución de la diversidad bacteriana a nivel de clase ha permitido generar un dendrograma para interrelacionar las muestras según

esta tendencia. Si bien a nivel de filo se distinguían dos grandes ramas en las que por un lado se agrupaban las muestras del tubo de lava “Búcara II de Montes Luna”, y por otro lado, el resto, en este caso, MZ03-10J y EP01-6F se agruparon para formar por separado una de las dos grandes ramas del árbol. Probablemente, la tendencia seguida por la mayor parte de los grupos identificados en ambas muestras ha tenido más peso que la destacable representatividad de *Nitriliruptoria* en EP01-6F. En la segunda rama del árbol se pudo observar la formación de dos subconjuntos, con las muestras MZ26, por un lado, y el resto de MZ03, por otro, donde el peso de los grupos de los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* parece ser el detonante de la categorización.

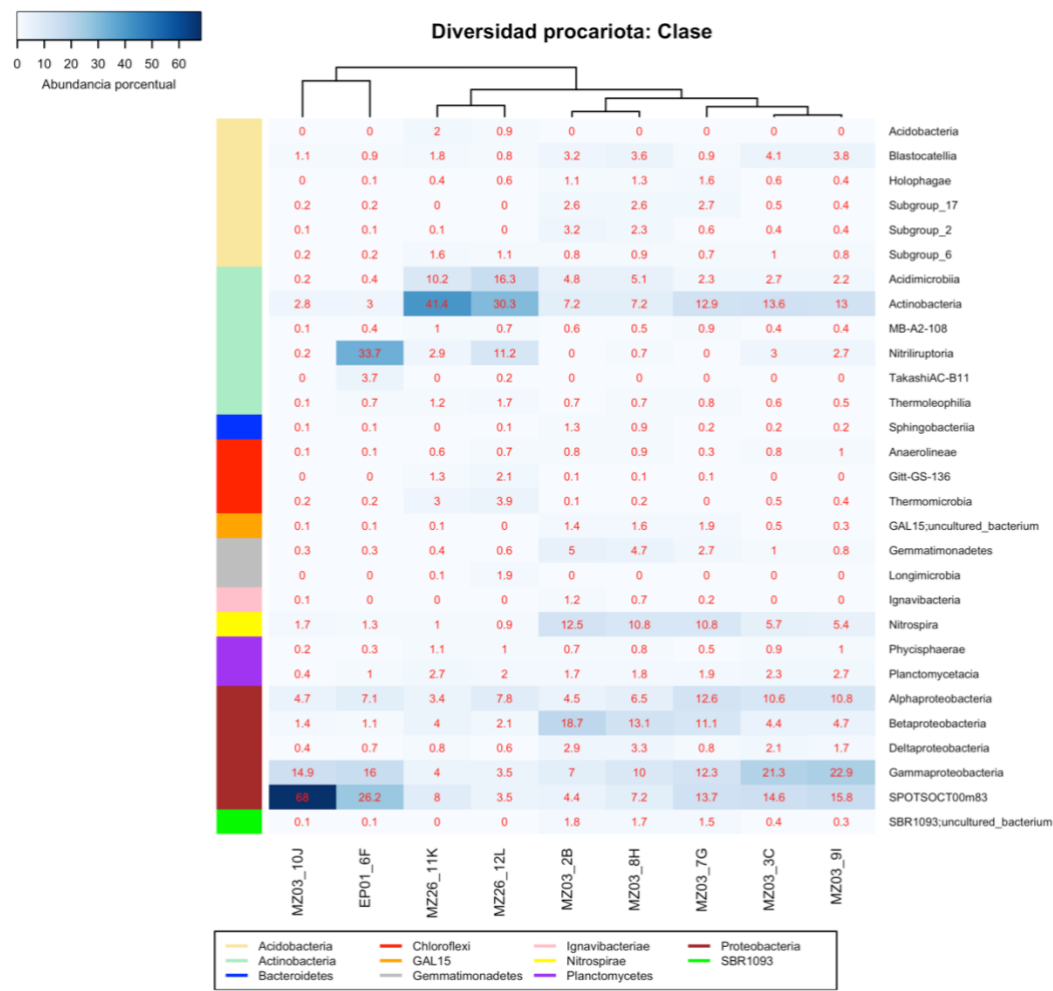


Figura 3.7. Mapa de calor del análisis de secuenciación masiva para el estudio taxonómico y abundancia para grupos a nivel de clase con una representatividad superior al 1% en, al menos, una muestra analizada. A la derecha de la imagen se describe la taxonomía de las secuencias analizadas y en la zona central el cuerpo del mapa de calor describe los porcentajes de abundancia en la muestra y en el margen izquierdo se ubica la barra de colores que relaciona a los grupos a nivel de clase con los grupos a nivel de filo donde se incluyen. En el margen inferior se indican las muestras analizadas y la leyenda con los grupos a nivel de filo y la relación de estos con los colores de la barra del margen izquierdo. En el margen superior de la imagen se ubica el dendrograma o árbol que relaciona a las muestras según la distribución y representatividad de los grupos identificados a nivel de clase.

3.2.1.3 ANÁLISIS TAXONÓMICO A NIVEL DE ORDEN

Los grupos taxonómicos identificados a nivel de orden no fueron tan diversos si se atiende a su clasificación en taxones a nivel de clase (Fig. 3.8). Es decir, si a nivel de clase se identificaron 28 grupos clasificados en 10 filos,

obteniendo una media de 2,8 grupos por cada filo, a nivel de orden se identificaron 32 grupos distribuidos en 25 clases, lo que supone una media de 1,28 ordenes por cada clase. Este hecho se explica por la identificación de filotipos “no cultivable” identificados a nivel de clase, lo que supone el último nivel taxonómico al cual el microorganismo puede ser identificado, así como la división en un mayor número de órdenes con una abundancia inferior al 1%, por lo que no se representan en el gráfico ya que no tendrían un rol determinante en la comunidad total.

Las proteobacterias presentaron el mayor número de identificaciones a nivel de orden, donde destacó la identificación de bacterias no cultivables clasificadas dentro de SPOTSOCT00m83, con valores de abundancia iguales a los obtenidos por este grupo en el nivel taxonómico anterior. *Gammaproteobacteria* dividió su representación en dos grupos, *Xanthomonadales* y un grupo denominado “no cultivable”. El primero tuvo mayor representatividad en la muestra MZ03-10J, con un 10,6%, mientras que el segundo presentó una mayor abundancia en MZ03-7G, MZ03-3C y MZ03-9I, con un 10,4%, 14,8% y 16,5% total. En la clase *Betaproteobacteria* se identificaron cuatro grupos a nivel de orden, el más diverso de los grupos analizados, donde a excepción del denominado “no cultivable”, ni B1-7BS, *Burkholderiales* o *Nitrosomonadales*, superaron el 5% de abundancia total en ninguna de las muestras analizadas. En cuanto a *Alphaproteobacteria*, se identificaron tres grupos, *Rhizobiales*, *Rhodospirales* y *Sphingomonadales*, donde solo el primero presentó una abundancia destacable para MZ03-7G, MZ03-3C y MZ03-9I, con el 11,8%, 7,1% y 7,7%, respectivamente. La división candidata B1-7BS fue anteriormente identificada como parte de la comunidad microbiana asociada a procesos biológicos del metano presente en los sedimentos del lago Kinneret, Israel (Bar-Or y col., 2015) y en zonas de influencia de un acuífero kárstico (Schneider y col., 2015).

Las actinobacterias identificadas presentaron seis grupos a nivel de orden dentro del mismo número de clases. *Acidimicrobiales*, *Pseudonocardiales*, *Euzebyales*, *Solirubrobacterales* y dos grupos no cultivables clasificados en las clases MB-A2-108 y TakashiAC-B11, representaron los grupos clasificados pertenecientes a este conjunto de bacterias. Pero son los tres primeros los que presentaron una abundancia relevante en distintas muestras. Así *Euzebyales* fue el único grupo con representación destacable en una muestra, EP01-6F, con un 33,7% total.

Aunque tiene un papel secundario, este grupo presentó un valor significativo con el 11,2% en MZ26-12L. *Pseudonocardiales* fue el grupo taxonómico a nivel de orden más abundante de los identificados en las muestras MZ26, mientras que también fue el grupo más abundante del filo *Actinobacteria* para las muestras MZ03-7G, MZ03-3C y MZ03-9I, con el 12,7%, 13,2% y 12,6%, respectivamente. Por último, *Acidimicrobiales* presentó valores significativos en MZ26-11K y MZ26-12L, con el 10,2% y el 16,3%, respectivamente. Maciejewska y colaboradores (2018) describieron la importancia de estos dos grupos en la población bacteriana de las formaciones de moonmilk de una cueva kárstica, lo que podría indicar que, efectivamente, estos grupos de actinobacterias favorecen la formación de estos espeleotemas independientemente de los tipos de cuevas, kársticas o tubos de lava, mientras que se den las condiciones necesarias y la disponibilidad de minerales carbonatados (Daza y col., 2016).

El resto de grupos no clasificados en los grupos anteriormente descritos tuvieron una abundancia poco representativa, a excepción de *Nitrospirales*, con el mismo porcentaje que anteriormente se obtuvo de la clase *Nitrospira* y del filo *Nitrospirae*, ya que fue el único grupo identificado.

El dendrograma generado en el mapa de calor para este nivel taxonómico presentó una caracterización similar a la observada a nivel de clase. En esta ocasión, el árbol se compuso de tres ramas principales, la más externa correspondiente a MZ03-10J, aislando más si cabe a esta muestra de la tendencia mostrada en la distribución de los grupos de bacterias identificados, otra rama con EP01-6F, y una última igual a la observada a nivel de clase, con subdivisiones con las muestras MZ26 y con el resto de muestras de MZ03.

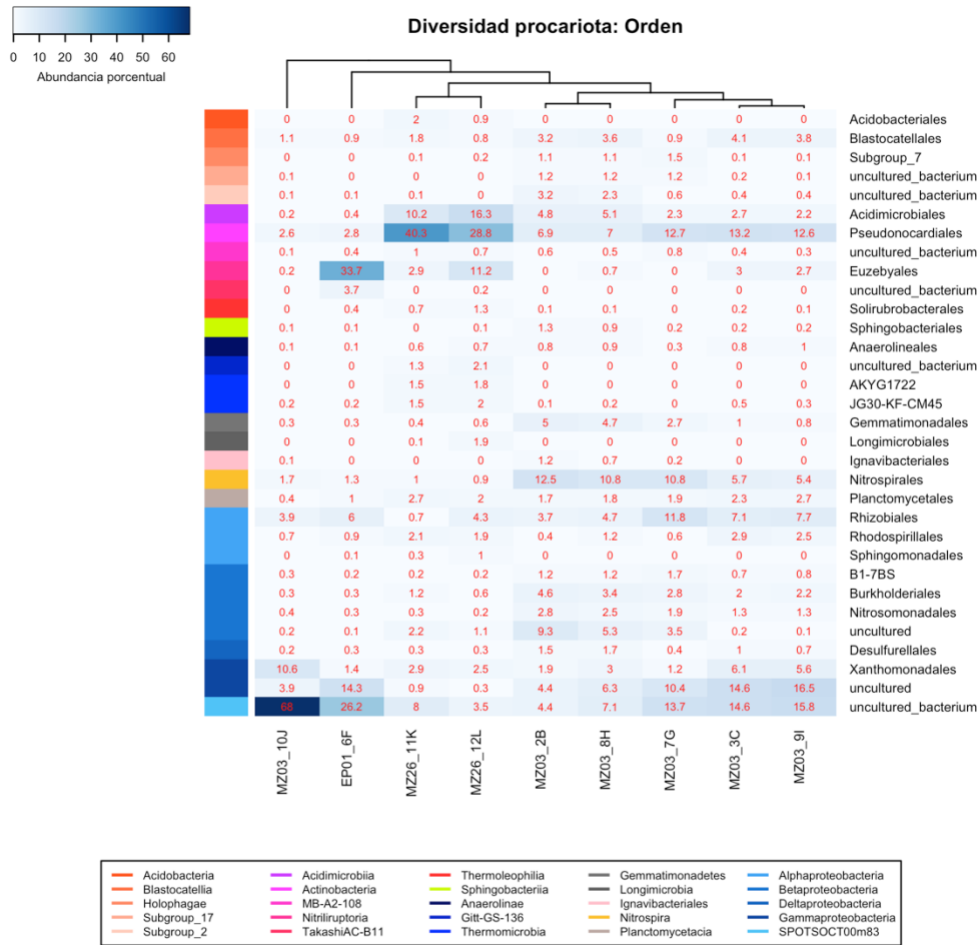


Figura 3.8. Mapa de calor del análisis de secuenciación masiva para el estudio taxonómico y abundancia para grupos a nivel de orden con una representatividad superior al 1% en, al menos, una muestra analizada. A la derecha de la imagen se describe la taxonomía de las secuencias analizadas y en la zona central el cuerpo del mapa de calor describe los porcentajes de abundancia en la muestra y en el margen izquierdo se ubica la barra de colores que relaciona a los grupos a nivel de orden con los grupos a nivel de clase donde se incluyen. En el margen inferior se indican las muestras analizadas y la leyenda con los grupos a nivel de clase y la relación de estos con los colores de la barra del margen izquierdo. En el margen superior de la imagen se ubica el dendrograma o árbol que relaciona a las muestras según la distribución y representatividad de los grupos identificados a nivel de orden.

3.2.1.4 ANÁLISIS TAXONÓMICO A NIVEL DE GÉNERO

Las secuencias que alcanzaron su identificación a nivel de género se representan en el último mapa de calor (Fig. 3.9). *Crossiella*, de la familia *Pseudonocardiaceae*, se presentó como una comunidad muy abundante para las muestras de moonmilk MZ26-11K y MZ26-12L, con el 38,9% y el 24,9%

total. También se situó como el grupo a nivel de género más abundante de las muestras MZ03-3C, MZ03-7G, MZ03-9I, MZ03-2B y MZ03-8H, con valores del 12,8%, 12,6%, 12,3%, 6,7% y 6,7%, respectivamente. Aunque otros autores observaron que *Streptomyces* fue el género más frecuentemente identificado y asociado a moonmilk (Maciejewska y col., 2017, 2018), *Crossiella*, un grupo normalmente asociado a suelos, ha sido recientemente identificado en la comunidad de microorganismos causantes del deterioro de patrimonio histórico en Francia mediante la cristalización de sales, de modo que el biofilm de la muestra cavaría podría funcionar como centro de nucleación del carbonato presente (Lepinay y col., 2017). El siguiente grupo con una representatividad principal se identificó como “no cultivable” dentro de la familia *Euzebyaceae*, del orden *Euzebyales*, para EP01-6F, con 33,7% total. Este también apareció en MZ26-12L con un 11% de abundancia.

Puesto que los grupos de proteobacterias más abundantes alcanzaron a clasificarse únicamente a nivel de orden, pocas comunidades a nivel de género destacaron por su abundancia. Tan solo un grupo “no cultivable” de la familia *Beijerinckiaceae* dentro de *Rhizobiales* mostró un 9,7% de abundancia total en MZ03-7G. Su presencia en el resto de muestras fue muy reducida o inexistente. El resto de grupos representados presentaron valores inferiores al 5% de abundancia total. En la familia *Beijerinckiaceae* se agruparon géneros fijadores del nitrógeno, así como grupos metilótrofos y metanótrofos como *Methylocapsa*, ya identificado en el análisis de las librerías de clones para el estudio de la comunidad de bacterias.

En el análisis de comunidades bacterianas a nivel de género destacó la presencia de una mayor parte de grupos identificados como “no cultivables”, lo cual constituyó una tendencia creciente desde el nivel de filo hasta el nivel de género con 14 grupos de 26 descritos como tal. Igualmente, la escasa presencia de géneros con elevada abundancia demostró la gran diversidad bacteriana en los tubos de lava.

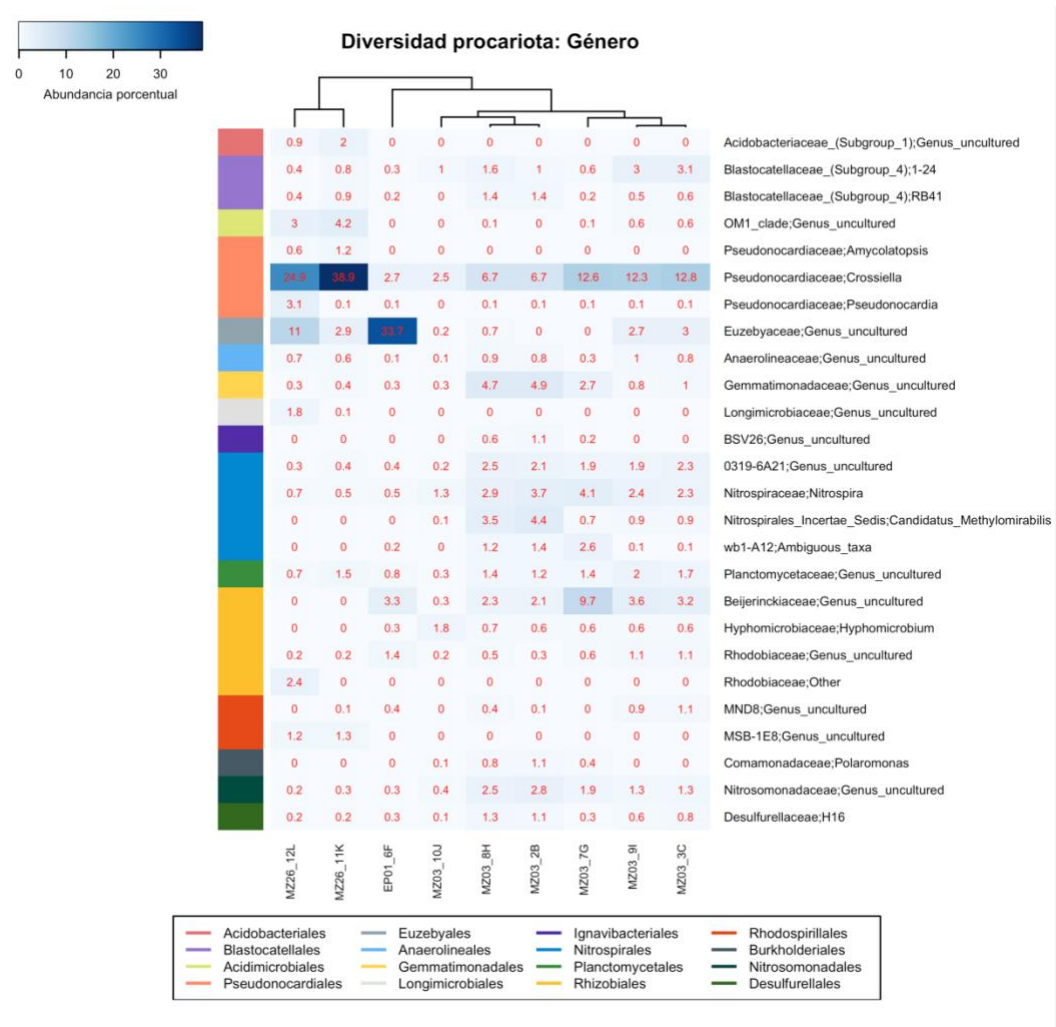


Figura 3.9. Mapa de calor del análisis de secuenciación masiva para el estudio taxonómico y abundancia para grupos a nivel de género con una representatividad superior al 1% en, al menos, una muestra analizada. A la derecha de la imagen se describe la taxonomía de las secuencias analizadas y en la zona central el cuerpo del mapa de calor describe los porcentajes de abundancia en la muestra y en el margen izquierdo se ubica la barra de colores que relaciona a los grupos a nivel de género con los grupos a nivel de orden donde se incluyen. En el margen inferior se indican las muestras analizadas y la leyenda con los grupos a nivel de orden y la relación de estos con los colores de la barra del margen izquierdo. En el margen superior de la imagen se ubica el dendrograma o árbol que relaciona a las muestras según la distribución y representatividad de los grupos identificados a nivel de género.

3.2.2 CÁLCULO DE LOS ÍNDICES DE DIVERSIDAD

3.2.2.1 DIVERSIDAD ALFA

La Tabla 3.10 presenta los índices de diversidad de Shannon, Simpson, y los estimadores de riqueza ACE y Chao1. En los análisis de diversidad se utilizaron los OTUs que estaban formados por un mínimo de dos secuencias, para minimizar los errores que se dan durante la secuenciación, evitar contabilizar a grupos presentes en la muestra por contaminación o a aquellos que por su baja abundancia no realizan una actividad biológica destacable. Los valores del índice Simpson mide la dominancia de especies en la muestra donde los valores se sitúan entre el 0 (una única especie dominante en la muestra) y el 1 (no hay especies que dominen en la muestra). El índice Shannon se centra en la riqueza de especies en la muestra. Los valores aumentan a mayor riqueza de especies y cuando la distribución de individuos entre las especies se vuelve uniforme. El índice “ACE” realiza una estimación del número de especies basado en el número de OTUs en la muestra teniendo en cuenta grupos abundantes y raros, considerando “abundantes” a aquellos que contienen más de 10 individuos y “raros” a aquellos con menos de 10. “Chao1” también realiza una estimación de especies en la muestra, en este caso, dando más valor a los OTUs con baja abundancia, con 2 secuencias por grupo. El parámetro “OTUs observados” indica el número de OTUs únicos en cada muestra.

	SIMPSON	SHANNON	OTUs observados	ACE	CHAO1
EP01-6F	0,902	6,627	5853	7725,056	7011,599
MZ03-3C	0,970	8,678	23645	28745,173	26128,811
MZ03-9I	0,975	9,260	22617	27277,277	24746,486
MZ03-2B	0,992	10,127	22292	26212,536	23946,604
MZ03-8H	0,989	9,451	21964	28065,795	25176,536
MZ26-11K	0,916	7,390	14365	16464,506	15240,344
MZ26-12L	0,968	8,244	17352	19172,347	18033,974
MZ03-10J	0,721	5,202	5407	7773,289	7024,074
MZ03-7G	0,981	9,519	7197	10768,391	9392,741

Tabla 3.10 Valores de diversidad Alfa con OTUs que contienen al menos 2 secuencias.

Los índices Simpson y Shannon coincidieron al asignar a MZ03-2B como la muestra más diversa. En esta muestra no había grupos que destacaran especialmente unos sobre otros, es decir, no había una

dominancia clara. No obstante, MZ03-10J y EP01-6F demostraron ser muy poco diversos, donde, especialmente en el primer caso, se sugería la presencia de grupos dominantes. De MZ26-11K y MZ26-12L, se comprobó que la primera muestra presentó menos diversidad y fue menos uniforme con respecto a la segunda. MZ03-7G se presentó como la tercera muestra más diversa según el índice Simpson, y la segunda según Shannon, indicando que había una distribución homogénea en los 7197 OTUs que conformaban la muestra.

Los estimadores del número de especies ACE y Chao1 coincidieron en situar a MZ03-3C como la muestra que presentó una estimación de especies mayor que el resto de bibliotecas. Sin embargo, ambos índices dependieron de los OTUs observados en cada muestra, lo que supuso un sesgo para aquellas que habían presentado un menor número de lecturas durante el proceso de secuenciación.

3.2.2.2 DIVERSIDAD BETA

Para el estudio de distancia entre las comunidades de las distintas muestras analizadas se diseñó un Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) basado en la métrica “Unifrac” en sus variantes “*Unweighted*” y “*Weighted*” (Fig. 3.10).

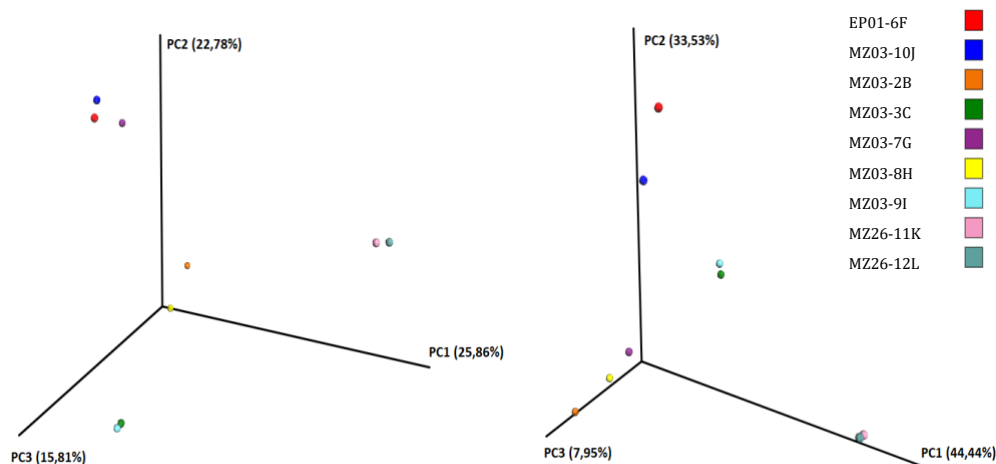


Figura 3.10. Estudio de matriz de distancia entre muestras o Diversidad Beta. Representación tridimensional del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA). Se representan los gráficos basados en la métrica de distancia Unifrac para comparar comunidades de procariotas inter-muestral, utilizando las variantes “Unweighted” (izquierda) y “Weighted” (derecha). Ambas son mediciones complementarias de la diversidad a nivel cualitativo (“Unweighted”) y cuantitativo (“Weighted”).

Los análisis de PCoA tridimensionales basados en la métrica “Unifrac” utilizan la filogenia entre grupos de OTUs generados por QIIME de acuerdo al umbral fijado del 97% de similitud entre las secuencias pertenecientes en cada muestra. Así la variante “Unweighted” determina una relación más estrecha entre las comunidades que presentan una mayor cantidad de grupos “raros”, considerándolos como tal a aquellos que se sitúan más alejados filogenéticamente unos de otros. En este caso, se distinguieron dos grupos de alta proximidad en sus comunidades de procariotas, como MZ26-11K y MZ26-12L, y MZ03-3C y MZ03-9I, seguidos de otros dos grupos diferenciados del resto, pero con comunidades no tan fuertemente relacionadas, como MZ03-2B y MZ03-8H, y especialmente MZ03-10J, EP01-6F y MZ03-7G.

La variante “Weighted”, por otro lado, normaliza los grupos presentes en cada muestra para relacionarlas de acuerdo a los más cercanos que presentan una mayor abundancia. De esta forma se pudieron distinguir, de nuevo, dos grupos bien cohesionados por la distribución de sus grupos, las muestras de MZ26 bien diferenciadas, por un lado, y MZ03-3C y MZ03-9I, por otro. EP01-6F y MZ03-10J se encontraba relativamente próximos, pero la

tendencia del segundo fue a aproximarse a las muestras correspondientes de MZ03. Igualmente, MZ03-7G, a diferencia de lo observado en la variante “Unweighted”, la distribución de grupos más abundantes la aproxima a las muestras MZ03-8H y MZ03-2B.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS CULTIVABLES DE LOS TUBOS DE LAVA

4.1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS

Como parte del estudio multidisciplinar para la caracterización de comunidades de microorganismos en los tubos de lava de la Isla de La Palma en las Islas Canarias, y de forma complementaria a las metodologías independientes de cultivo del Capítulo 3, se implementaron metodologías dependientes de cultivo. El fundamento de este apartado es doble, eliminar los sesgos a los que la biología molecular se ve sometida, e identificar nuevas especies microbianas con producción potencial de metabolitos secundarios (Donachie y col., 2007; Riquelme y col., 2017; Yasir, 2017).

A continuación, se presentan las Tablas 4.1 a 4.10 que reflejan la identificación a nivel de género y especie, y su clasificación en filos, de las bacterias presentes en los tubos de lava estudiados en base a técnicas de microbiología tradicional de cultivos sólidos y líquidos. La identificación y clasificación taxonómica de las cepas aisladas se realizó mediante la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S con aquellas depositadas en la base de datos EzBioCloud, indicando la especie con porcentaje de similitud más próxima.

La Tabla 4.16 contiene la identificación de los hongos aislados de las muestras estudiadas. La identificación taxonómica se realizó comparando las secuencias de los hongos aislados con la base de datos nucleotídica no redundante “nt” de NCBI mediante alineamiento con herramienta BLAST.

Se identificaron un total de 118 cepas bacterianas taxonómicamente distribuidas en 10 muestras de cuatro tubos de lava distintos, así como se identificaron 15 hongos de seis muestras obtenidas en dos tubos de lavas diferentes. Se describieron tres nuevas cepas de *Streptomyces*, si bien existen indicios de que podrían haberse aumentado el número de nuevas especies bacterianas. De esta forma, estudios futuros podrían continuar la línea orientada a identificar y describir nuevas cepas clasificadas en diferentes grupos taxonómicos.

El filo más abundante del total de bacterias identificadas fue *Firmicutes*, con 42 cepas seguido del filo *Actinobacteria* con 40 cepas. Seguía el filo *Proteobacteria* con 34 cepas identificadas, y, por último, *Bacteroidetes*,

que completó la identificación taxonómica de los aislados a nivel de filo, con dos cepas identificadas. A nivel de género, *Streptomyces* y *Bacillus* destacaron por su abundancia con respecto al resto de grupos clasificados dentro de los filos *Actinobacteria* y *Firmicutes*, respectivamente, identificando 19 de los 40 aislados de actinobacterias en el género *Streptomyces*, y 30 *Bacillus* de los 42 aislados clasificados como *Firmicutes*. En el caso de las proteobacterias, se observó una distribución de género más homogénea con respecto a la abundancia de cepas aisladas e identificadas. *Pseudomonas* fue el grupo con mayor número de representantes aislados con siete, seguido de *Cupriavidus* con seis, *Pandoraea* con cinco, y *Sphingomonas* y *Acinetobacter* con cuatro cepas aisladas en cada género. Además, *Proteobacteria* se caracterizó por la alta diversidad taxonómica presentada a nivel de género con respecto al resto de filos identificados en el estudio, con 13 géneros clasificados en este filo. *Actinobacteria* presentó una diversidad inferior con nueve géneros, mientras que *Firmicutes* únicamente presentó cinco géneros identificados entre los aislados. Las dos bacterias clasificadas como *Bacteroidetes* se han identificado como especies del género *Chryseobacterium*.

En relación a los tubos de lavas estudiados, se observaron variaciones significativas a nivel taxonómico y de abundancia, no solo entre los distintos tubos de lava, sino que también a nivel de muestras se apreciaron distribuciones heterogéneas de la diversidad bacteriana.

4.1.1 CEPAS AISLADAS DEL TUBO DE LAVA “CUEVA DEL LLANO DE LOS CAÑOS”: MZ04

En la “Cueva del Llano de los Caños” se estudiaron dos muestras recolectadas de mucolitos de color amarillo-anaranjado, de aspecto mucoso, que cubrían diversos espeleotemas de roca de lava, procediendo al cultivo, aislamiento e identificación taxonómica final de un total de 27 bacterias (Fig. 4.1 y Tablas 4.1 y 4.2). En términos absolutos, el filo *Actinobacteria* se presentó como el grupo más representativo, con 13 cepas aisladas, seguido de *Proteobacteria* con 10. Menos representativo apareció el filo *Firmicutes* con cuatro cepas aisladas. No obstante, existieron diferencias en las identificaciones de los grupos taxonómicos en términos relativos.

La muestra MZ04-2B (Tabla 4.1) presentó una abundancia de actinobacterias muy superior, con 9 cepas identificadas, con respecto a las cinco cepas clasificadas en el filo *Proteobacteria* y dos en *Firmicutes*. En cambio, para la muestra MZ04-3C (Tabla 4.2) fue el filo *Proteobacteria* el grupo con mayor representatividad, con seis cepas aisladas, seguido de *Actinobacteria* con cuatro bacterias y *Firmicutes*, con uno. Los géneros de actinobacterias identificadas en ambas muestras presentaron una variada diversidad taxonómica. *Microbacterium*, *Rhodococcus*, con tres cepas identificadas en cada género, y *Pseudarthrobacter* y *Arthrobacter* con dos y una cepas identificadas, respectivamente, fueron los grupos de actinobacterias aislados en MZ04-2B. *Acinetobacter* y *Pseudomonas* fueron los dos únicos géneros del filo *Proteobacteria*, con tres y dos cepas aisladas, respectivamente. En el filo *Firmicutes*, se identificaron dos especies del género *Paenibacillus*.

Streptomyces monopoliza la identificación de actinobacterias aisladas en MZ04-3C, con cuatro cepas. *Cupriavidus* con cinco se presentó como el género más abundante dentro del filo *Proteobacteria*, donde también se identificó una cepa como *Sphingomonas*. En *Firmicutes*, solamente se aisló una bacteria identificada en el género *Paenibacillus*. *Acinetobacter* y *Pseudomonas* fueron otros géneros del filo *Proteobacteria*, con tres y dos cepas aisladas, respectivamente.

Los orígenes de los aislamientos de las cepas cultivadas más próximas a las bacterias aisladas en este tubo de lava procedieron mayoritariamente de suelos y otras muestras ambientales, especialmente en MZ04-3C, mientras que algunas de las bacterias más cercanas a las cepas aisladas en MZ04-2B tenían como origen muestras de tejidos o fluidos de mamíferos.



2. *Streptomyces* 3. *Rhodococcus* 4. *Paenibacillus* 5. *Acinetobacter*
6. *Cupriavidus* 8. *Sphingomonas* 9. *Pseudoarthrobacter* 10. *Pseudomonas*
28. *Microbacterium* 29. *Arthrobacter*

Figura 4.1. Distribución de cepas bacterianas aisladas en el tubo de lava "Cueva del Llano de los Caños".

4.1.1.1 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ04-2B

Microbacterium es un género muy abundante en la naturaleza, con 110 especies conocidas (<http://www.bacterio.net/microbacterium.html>). Se encuentra distribuido en distintos ecosistemas del planeta, como sedimentos marino o muestras de aire, pero es más propio de suelos. En cuevas se ha aislado este género tras utilizar distintas condiciones de calor, pH y concentraciones de sales de calcio (Fang y col., 2017). Muchos de sus miembros son halófilos o halotolerantes, como el caso de la especie *M. proteolyticum*, de la cual se identificaron tres cepas en MZ03-2B. Esta bacteria fue originalmente aislada de las raíces de *Halimione portulacoides*, un arbusto halófito que crece en marismas (Alves y col., 2015).

Rhodococcus también se ha localizado en diversos ambientes y es muy abundante, con 66 especies identificadas. *R. erythropolis* es una bacteria ampliamente estudiada debido a su capacidad para desulfurar combustibles

fósiles como el petróleo y el carbón, así como para producir biosurfactentes, de manera que también ha sido estudiada en áreas tan antagónicas como la biorremediación de suelos y aguas contaminadas y diferentes campos de la medicina (Rodrigues y col., 2006; Pi y col., 2017; Rahpeyma y col., 2018; Pacwa-Płociniczak y col., 2019). *R. corynebacterioides* produce pigmentos carotenoides y se ha documentado su implicación en el deterioro del patrimonio cultural por pigmentación roja y rosa de los restos arqueológicos de la “Casa del Bicentenario”, en Herculano, Italia, originalmente cubiertos por lava del volcán Vesubio (Tescari y col., 2018).

Pseudarthrobacter es un género relativamente nuevo cuyas especies estaban clasificadas originalmente en *Arthrobacter* (Busse, 2016). *P. equi*, con dos cepas aisladas, ha sido recientemente estudiada por estar involucrado en la biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) presentes en suelos contaminados (Nagalakshmi y col., 2018).

Acinetobacter es un grupo con mucho interés clínico puesto que se ha comprobado su capacidad para resistir a antibióticos y otros fármacos. Distintas cepas de las especies *A. bereziniae* y *A. guillouiae* han sido estudiadas con el objetivo de identificar los mecanismos asociados al conjunto de genes que favorecen esta resistencia (Brovedan y col., 2016; Li y col., 2016; Tian y col., 2018).

El género *Pseudomonas* es ampliamente conocido por el espécimen más estudiado del grupo, *P. aeruginosa*, una bacteria patógena multiresistente con la capacidad para producir biocompuestos interesantes como antibióticos o antifúngicos (Kerr, 1994; Gionco y col., 2017). *P. paralactis* es una especie que no ha trascendido más allá de su reciente descubrimiento, a partir de muestras en fluidos de mamíferos (von Neubeck y col., 2017). *Pseudoarthrobacter equi* y *Pseudomonas paralactis* podrían estar asociadas al ganado que circunda la superficie del tubo de lava, como evidenció la abundante presencia de excrementos que se apreciaron.

Paenibacillus es un grupo originalmente incluido en el género *Bacillus* con especies que presentan metabolismos muy versátiles. Principalmente localizados en suelo, algunos son capaces de producir antibióticos, otros son útiles para remediar entornos contaminados, favoreciendo el crecimiento de determinadas especies vegetales, o se presentan como patógenos oportunistas (Grady y col., 2016). *P. ehimensis* y *P. tianmuensis* han aportado

numerosos usos biotecnológicos para la industria farmacéutica (Qian y col., 2012; Seo y col., 2016). *P. ehimensis* ha sido igualmente identificado en aguas termales debido a su elevada termorresistencia (Sahay y col., 2017).

Tabla 4.1. Bacterias presentes en la “Cueva del Llano de los Caños”. Aisladas de la muestra MZ04-2B.

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0432B1	LR584287	<i>Microbacterium proteolyticum</i> /raíces <i>Halimione portulacoides</i> (KM359785)	98.23
MZ0479B	LR584307	<i>Microbacterium proteolyticum</i> /raíces <i>Halimione portulacoides</i> (KM359785)	98.96
MZ0435B	LR584288	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> /Pastos (AJ277840)	100
MZ0482B	LR584385	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> /Aire (AF430066)	99.87
MZ0480B1	LR584308	<i>Rhodococcus erythropolis</i> /Sedimentos Océano Pacífico (AP008957)	99.64
MZ0484B	LR584311	<i>Rhodococcus erythropolis</i> /Sedimentos Océano Pacífico (AP008957)	99.56
MZ0480B2	LR584309	<i>Pseudarthrobacter equi</i> /Muestra genitales caballo (LT629779)	98.91
MZ0459B2	LR584299	<i>Pseudarthrobacter equi</i> /Muestra genitales caballo (LT629779)	100
MZ0430B1	LR584284	¹ <i>Arthrobacter</i> sp	99.31
MZ0430B2	LR584285	<i>Acinetobacter guillouiae</i> /Herida ser humano (APOS01000028)	99
MZ0429B	LR584283	<i>Acinetobacter bereziniae</i> /Herida ser humano (AIEI01000248)	99.79
MZ0432B2	LR584286	<i>Acinetobacter bereziniae</i> /Herida ser humano (AIEI01000248)	98.55
MZ0481B	LR584310	<i>Pseudomonas paralactis</i> /Leche cruda bovina (KP756923)	100
MZ0446B	LR584294	<i>Pseudomonas paralactis</i> /Leche cruda bovina (KP756923)	99.87
MZ0478B1	LR584377	<i>Paenibacillus ehimensis</i> /Suelos de Jardín (AY116665)	99.56
MZ0478B2	LR584378	<i>Paenibacillus tianmuensis</i> /Suelos de montaña (FJ719490)	100

¹ Cepa que comparte similitud con dos especies: *Arthrobacter oryzae* (AB279889), aislado originalmente en un arrozal, y *Arthrobacter pascens* (X80740), aislado originalmente en suelos.

4.1.1.2 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ04-3C

Streptomyces es considerado el grupo de actinobacterias más conocido por su enorme potencial para producir compuestos bioactivos. Se estima que el 45% de los biocompuestos derivados de microorganismos deriva de las actinobacterias, de los que el 80% son producidos por *Streptomyces*

(Goodfellow y Fiedler, 2010). En cuevas es un género muy recurrente, lo que ha despertado un creciente interés en los últimos años debido a su implicación en los procesos de biomineralización y como fuente de producción de nuevos compuestos bioactivos (Maciejewska y col., 2016; Baskar y col., 2016). Diferentes cepas de *S. aureus* han sido motivo de estudio por presentar actividad inhibidora del crecimiento para hongos y por su capacidad para biorremediar suelos contaminados (Dalitz y col., 2017). *S. spiroverticillatus* es un reconocido productor de antimicrobianos (Suganuma y col., 1995; Nogawa y col., 2010).

El género *Sphingomonas* son bacterias Gram negativa con especímenes identificados en medios subterráneos implicados en procesos biogeoquímicos relacionados con la precipitación de manganeso (Kimura y col., 2014; Mayanna y col., 2015). También presenta alguna especie causante de infecciones en humanos (Göker y col., 2017) *S. trueperi* es una especie fijadora de nitrógeno, que originalmente fue clasificada como *Pseudomonas* (Anderson, 1955; Kampfer y col., 1997).

Cupriavidus necator es una especie depredadora de otras bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, y es ampliamente estudiada debido a su elevado interés biotecnológico industrial (Makkar y Casida, 1987; Chee, 2019).

Cepas de *Paenibacillus glucanolyticus* han sido estudiadas en los últimos años por su capacidad para degradar lignocelulosa y por su potencial patogenicidad (Mathews y col., 2016; Celandroni y col., 2016).

Tabla 4.2. Bacterias presentes en la “Cueva del Llano de los Caños”. Aisladas de la muestra MZ04-3C.

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0467C	LR584386	<i>Streptomyces aureus</i> /Suelo pecuario (AB249976)	99.78
MZ0468C	LR584303	¹ <i>Streptomyces</i> sp.	99.87
MZ0427C4	LR584379	² <i>Streptomyces</i> sp.	99.61
MZ0421C	LR584281	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i> /Suelos (AB249921)	99.19
MZ04101C	LR584325	<i>Sphingomonas trueperi</i> /Suelos (X97776)	99.88
MZ0451C	LR584296	<i>Cupriavidus necator</i> /Suelos (CP002878)	99.87
MZ04107C	LR584329	<i>Cupriavidus necator</i> /Suelos (CP002878)	100
MZ0462C	LR584300	<i>Cupriavidus necator</i> /Suelos (CP002878)	100
MZ0450C	LR584295	<i>Cupriavidus necator</i> /Suelos (CP002878)	100
MZ0464C	LR584301	<i>Cupriavidus necator</i> /Suelos (CP002878)	100

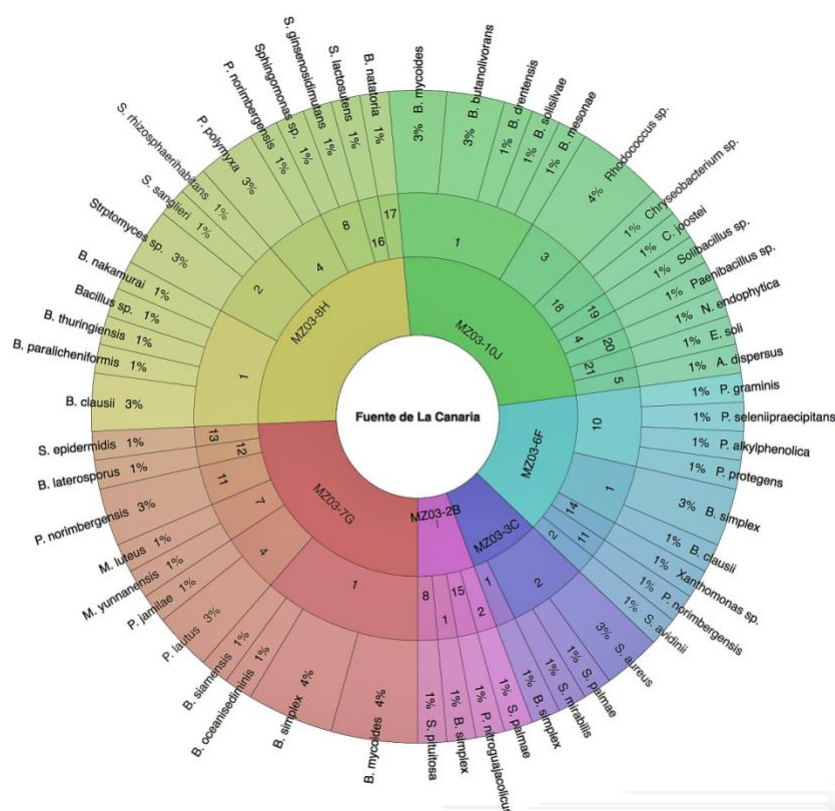
Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0424C1	LR584282	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> /Suelos jardines (AB073189)	99.71

¹ Cepa que comparte similitud con dos especies: *Streptomyces caeruleatus* (KQ948975), aislado originalmente en rizosfera de tomatera y *Streptomyces canus* (KQ948708), aislado originalmente en suelos.

² Cepa que comparte similitud con dos especies: *Streptomyces gardneri* (AB249908), aislado originalmente en aire contaminado y *Streptomyces zaomyceticus* (AB184346), aislado originalmente en suelos.

4.1.2 CEPAS AISLADAS DEL TUBO DE LAVA “FUENTE DE LA CANARIA”: MZ03

Del tubo de lava “Fuente de La Canaria” se han utilizado seis muestras para cultivo y aislamiento de bacterias (Fig. 4.2 y Tablas 4.3-4.8). Se aislaron un total de 72 cepas bacterianas, de las que 34 fueron clasificadas dentro de *Firmicutes*, 18 de *Actinobacteria*, 18 de *Proteobacteria* y dos de *Bacteroidetes*. El género *Bacillus* volvió a ser el grupo más representativo dentro del filo *Firmicutes*, el cual se ha encontrado en cada una de las seis muestras analizadas. A nivel de especies, *B. simplex*, *B. mycoides* y, en menor medida, *B. clausii*, representaron la mayor parte de las bacterias identificadas.



- | | | | |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1. <i>Bacillus</i> | 2. <i>Streptomyces</i> | 3. <i>Rhodococcus</i> | 4. <i>Paenibacillus</i> |
| 5. <i>Acinetobacter</i> | 7. <i>Micrococcus</i> | 8. <i>Sphingomonas</i> | 9. <i>Pseudoarthrobacter</i> |
| 10. <i>Pseudomonas</i> | 11. <i>Pandorea</i> | 12. <i>Brevibacillus</i> | 13. <i>Staphylococcus</i> |
| 14. <i>Xanthomonas</i> | 15. <i>Paenoarthrobacter</i> | 16. <i>Sphingobium</i> | 17. <i>Blastomonas</i> |
| 18. <i>Chryseobacterium</i> | 19. <i>Solibacillus</i> | 20. <i>Nonomuraea</i> | 21. <i>Enterobacter</i> |

Figura 4.2. Distribución de cepas bacterianas aisladas en el tubo de lava “Fuente de la Canaria”.

4.1.2.1 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ03-7G

MZ03-7G se caracterizó por presentar unas elevadas condiciones de humedad, y presentar un aspecto de gel arcilloso sobre la roca de lava. En dicho gel aparecían colonias de microorganismos de coloración blanca. Los aislamientos de esta muestra correspondieron principalmente al filo *Firmicutes*, ya que 13 de las 17 cepas aisladas se clasificaron en este grupo. Al contrario de lo que se apreció en las muestras analizadas de la “Cueva del Llano de los Caños”, el género *Paenibacillus* tuvo un papel secundario con respecto a *Bacillus*, que se situó como el grupo más representativo de la muestra con ocho cepas identificadas. Asimismo, los lugares de aislamiento

de las bacterias más cercanas a las cepas aisladas dentro de este género provenían de suelos, sedimentos y rizosferas. Menos representatividad presentó las cepas clasificadas en el filo *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, con dos bacterias cada grupo, que también guardaban relación con suelos y sedimentos.

El género *Bacillus* es uno de los grupos de bacterias más extensamente estudiados. La gran variedad de especies identificadas puede ser localizada en diferentes ambientes a lo largo del planeta, y es crucial en numerosos procesos de interés para el ser humano debido a la gran cantidad de bioproductos que diferentes especies de este grupo sintetizan, desde la industria farmacéutica hasta la agroalimentaria (Dawar y col., 2010; Abriouel y col., 2011; Sumi y col., 2015). Se identificaron tres cepas como *B. mycoides*, especie perteneciente al grupo de *B. cereus*, reconocida especie patógena causante de multitud de infecciones como septicemia o endocarditis (Drobniewski, 1993) y reservorio de antibióticos lantipéptidos (Xin y col., 2015). *B. mycoides* ha sido comúnmente utilizado para evaluar la efectividad de diferentes agentes antibacterianos (Kosanić y Ranković, 2011; Saxena y Yadav, 2018). *B. simplex* es una bacteria con demostrada capacidad para degradar compuestos contaminantes en suelos, así como efectiva habilidad para solubilizar fosfatos (Rabodonirina y col., 2019; Rezakhani y col., 2019). *B. oceanisediminis* es una especie termotolerante con una enorme resistencia a metales pesados, lo que ha abierto la puerta a su uso en remediación de ambientes contaminados (Jung y col., 2016).

Dos cepas de *Paenibacillus lautus* fueron aisladas en la muestra. Esta especie termófila se caracteriza por su habilidad metabólica para degradar compuestos lignocelulósicos y es considerado un patógeno oportunista (Celandroni y col., 2016; Hemati y col., 2018). *P. jamilae* ha despertado el interés de la industria por la secreción de un exopolisacárido que funciona como adsorbente de metales pesados, así como por la producción de un biofloculante con propiedades antiinflamatorias y pro-coagulantes (Morillo-Pérez y col., 2008; Zhong y col., 2018).

Brevibacillus laterosporus es una bacteria patógena de invertebrados de la cual surgió el antibiótico brevibacilina (Rui, 2013; Yang y col., 2017).

Staphylococcus epidermidis es una bacteria patógena, muy frecuente en el cabello y piel del ser humano, por lo que aparentemente su presencia en

la muestra podría deberse a una contaminación de la misma. Sin embargo, en un estudio reciente Mudgil y colaboradores (2018) probaron el potencial biomineralizador de *S. epidermis*, de forma que pudiera estar asociada a la biogénesis de espeleotemas.

Dos bacterias fueron clasificadas en el género *Micrococcus*. *M. yunnanensis* es una bacteria halotolerante endófito con cepas identificadas con la habilidad de producir antibióticos y degradar PAH (Ranjan y Jadeja, 2017; Ma, 2017), pero muy común en cuevas (ver tesis de Irene). *M. luteus* es una especie de interés histórico puesto que fue Fleming quien la utilizó para demostrar su actividad bacteriolítica. (Fleming y Allison, 1922). También es una bacteria endófito halotolerante que comúnmente se utiliza para medir el potencial de diferentes antibióticos (Zhang y col., 2018; Kamboj y col., 2019).

Se aislaron dos cepas identificadas como *Pandoraea norimbergensis*. Esta especie fue denominada inicialmente *Burkholderia norimbergensis* y tenía la capacidad de oxidar azufre en condiciones de elevada alcalinidad (Witkke y col., 1997).

Tabla 4.3. Bacterias presentes en la “Fuente de La Canaria”. Aisladas de la muestra MZ03-7G

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ035G	LR584375	<i>Bacillus oceanisediminis</i> /Sedimento marino (GQ292772)	97.55
MZ0398G	LR584321	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	99.06
MZ03100G2	LR584323	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	99.74
MZ0383G	LR584353	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	99.88
MZ0388G1	LR584357	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCVO01000086)	100
MZ031G	LR584330	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCVO01000086)	99.87
MZ035G2	LR584332	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCVO01000086)	100
MZ032G	LR584331	<i>Bacillus siamensis</i> /Comida Tailandesa (AJVF01000043)	100
MZ03100G4	LR584324	<i>Paenibacillus lautus</i> /Tracto intestinal (D78473)	99.19
MZ03100G1	LR584322	<i>Paenibacillus lautus</i> /Tracto intestinal (D78473)	98.97
MZ03122G2	LR584376	<i>Paenibacillus jamilae</i> /Alpechín y compost de maíz (AJ271157)	98.84
MZ039G	LR584333	<i>Brevibacillus laterosporus</i> /Desconocida (AB073189)	99.88
MZ03122G1	LR584374	<i>Staphylococcus epidermidis</i> /Piel humana (L37605)	100
MZ0397G	LR584320	<i>Micrococcus yunnanensis</i> /Raíces <i>Polyspora axillaris</i> (FJ214355)	99.79
MZ0388G2	LR584314	<i>Micrococcus luteus</i> /Suelos (CP001628)	100
MZ038G1	LR584352	<i>Pandoraea norimbergensis</i> /Capa óxica de sedimento sulfuroso (AY268174)	99.52

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ03119G	LR584365	<i>Pandoraea norimbergensis</i> /Capa óxica de sedimento sulfuroso (AY268174)	99.52

4.1.2.2 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ03-6F

Muy próxima a la muestra anterior, MZ03-6F presentó una abundante colonización de colonias principalmente amarillas, pero con puntuales colonias blancas que colonizaban la roca de lava. El análisis de identificación de cepas aisladas tras cultivo (Tabla 4.4.) ha deparado, al contrario de la muestra anterior, una mayoría de cepas clasificadas dentro del filo *Proteobacteria*, con 6 de 10 aislados. Con menor representatividad se han identificado a 3 cepas en el filo *Firmicutes* y una en *Actinobacteria*. Las referencias que apuntan al origen del aislamiento de las bacterias más próximas a los aislados estudiados indican que estas habitan áreas de influencia a los tubos de lava y otros medios subterráneos. De hecho, la mayor parte de las proteobacterias se han identificado como *Pseudomonas* (4), cuyos lugares de aislamiento están directamente relacionados con la fracción suelo-vegetación. La presencia de *Bacillus* es recurrente en este tubo de lava y en los siguientes estudiados a diferencia de, como se ha observado con anterioridad, la “Cueva del Llano de los Caños” que se diferencia del resto al no presentar cepas clasificadas en este género.

Pseudomonas graminis es una especie con cepas utilizadas en la industria alimentaria como control biológico (Mikiciński y col., 2011; Alegre y col., 2013). *P. seleniipraecipitans* crece en presencia de elevadas concentraciones de selenito y selenato reduciéndolos a selenio elemental (Hunter, 2014). *P. alkylphenolica* degrada alquifenoles, compuestos presentes en detergentes, emulsionantes, herbicidas, etc. (Song y col., 2018). *P. protegens* es una bacteria endófito resistente a metales pesados con reconocida capacidad para producir compuestos antimicrobianos (Henkels y col., 2014; Liu y col., 2018).

El género *Xanthomonas* está compuesto principalmente por patógenos de plantas. Algunos han sido identificados en cuevas kársticas desempeñando un papel relevante en procesos de precipitación de carbonato cálcico (Cacchio y col., 2003; Büttner y Bonas, 2010).

Bacillus clausii es una bacteria alcalófila utilizada como probiótico con capacidad para producir antibióticos y antioxidantes (Senesi y col., 2001; Rochín-Medina y col., 2018).

La especie *Streptomyces avidinii* ha sido motivo de estudio desde 1963 por su capacidad para producir antibióticos, y posteriormente por la obtención de la estreptavidina, una proteína de elevada afinidad con la biotina, lo que le confiere múltiples usos en biotecnología (Stapley, 1963; Hofmann y col., 1980).

Tabla 4.4. Bacterias presentes en la “Fuente de La Canaria”. Aisladas de la muestra MZ03-6F

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0375F	LR584305	<i>Pseudomonas graminis</i> /Pastos (Y11150)	98.41
MZ0354F	LR584341	<i>Pseudomonas seleniipraecipitans</i> /Suelos (FJ422810)	99.61
MZ0356F	LR584342	<i>Pseudomonas alkylphenolica</i> /Suelos (CP009048)	98.96
MZ03109F	LR584373	<i>Pseudomonas protegens</i> /Cultivos (CP003190)	100
MZ0352F	LR584339	¹ <i>Xanthomonas</i> sp/Gramíneas (AP008957)	100
MZ0353F	LR584340	<i>Pandoraea norimbergensis</i> /Capa óxica de sedimento sulfuroso (AY268174)	99.49
MZ0386F	LR584313	<i>Bacillus clausii</i> /Suelos (X76440)	98.85
MZ03105F	LR584327	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCV001000086)	99.75
MZ03106F	LR584328	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCV001000086)	99.89
MZ0376F	LR584306	<i>Streptomyces avidinii</i> /Suelos (AB184395)	99.80

¹ Cepa que comparte similitud con *Xanthomonas theicola* (Y10763), *Xanthomonas hortorum* (Y10759) y *Xanthomonas arboricola* (Y10757).

4.1.2.3 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ03-2B

La muestra MZ03-2B se define por la presencia de formaciones mucosas sobre el sustrato de roca de lava. Se han aislado cuatro bacterias, de ellas dos se han clasificado en *Actinobacteria*, una en *Firmicutes* y una en *Proteobacteria* (Tabla 4.5). El análisis del gen ARNr 16S permitió clasificar a estas cepas en los géneros *Streptomyces*, *Paenoarthrobacter*, *Sphingomonas* y a la especie *Bacillus simplex*, muy extendida por numerosas muestras estudiadas de los distintos tubos de lava.

Streptomyces palmae es una bacteria de reciente identificación con margen de estudio funcional, ya que parece presentar características antifúngicas (Sujarit, 2016).

El género *Paenarthrobacter*, al igual que *Pseudoarthrobacter*, proviene de una escisión de *Arthrobacter* (Busse, 2016). *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* es una especie con reconocida capacidad para degradar y transformar compuestos nitroaromáticos, lo que le ha supuesto formar parte de estrategias de degradación de suelos y aguas contaminadas por estas moléculas (Kotouckova, 2004; Tvrzová y col., 2006).

Sphingomonas pituitosa ha sido anteriormente estudiada por producir un biopolímero denominado PS-EDIV cuyas propiedades han sido utilizadas para encapsular compuestos contaminantes en entornos contaminados (Denner y col, 2001; Schultheis y col., 2008).

Tabla 4.5. Bacterias presentes en la “Fuente de La Canaria”. Aisladas de la muestra MZ03-2B

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0348B	LR584291	<i>Streptomyces palmae</i> /Rizosfera de <i>Elaeis guineensis</i> (LC073309)	98.74
MZ0372B2	LR584304	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> /Suelos (AJ512504)	99.41
MZ0318B	LR584280	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCV001000086)	99.85
MZ03103B	LR584326	<i>Sphingomonas pituitosa</i> /Agua eutrofizada (AJ243751)	99.65

4.1.2.4 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ03-3C

A escasa distancia de la muestra anterior se localizaba la zona de muestreo de MZ03-3C que, si bien compartía características físicas con MZ03-2B, morfológicamente se diferenciaba de esta por el desarrollo de espeleotemas de tipo estalactitas. De las cinco cepas aisladas en esta muestra (Tabla 4.6) destacaron los cuatro *Streptomyces* identificados frente a un *Bacillus* de la especie *simplex*, como se observó en la muestra anterior. Todas las especies más próximas identificadas en el análisis del gen ARNr 16S fueron originalmente aisladas en suelos.

Streptomyces mirabilis es una bacteria estudiada en la década de los 50 del siglo XX por su capacidad para producir antibióticos (Ruschmann, 1952; Boing, 1958), pero que hasta principios del siglo XXI no volvió a tener relevancia. Su resistencia a elevadas concentraciones de metales pesados en suelos le ha servido para formar parte de estrategias de recuperación de suelos degradados (Schütze y col., 2014).

Tabla 4.6. Bacterias presentes en la “Fuente de La Canaria”. Aisladas de la muestra MZ03-3C

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0337C2	LR584290	<i>Streptomyces palmae</i> /Rizosfera de <i>Elaeis guineensis</i> (LC073309)	98.71
MZ0385C	LR584312	<i>Streptomyces aureus</i> /Suelo pecuario (AB249976)	99.90
MZ0353C	LR584298	<i>Streptomyces aureus</i> /Suelo pecuario (AB249976)	99.88
MZ0341C3	LR584289	<i>Streptomyces mirabilis</i> /Suelos (FJ422810)	100
MZ0352C	LR584297	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCV001000086)	99.50

4.1.2.5 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ03-8H

Los tubos de lava se caracterizan por su conexión con la superficie a través de la aparición de grietas en las paredes y techos, por el colapso de estos o/y por la acción mecánica de las raíces de la vegetación que se encuentra en la superficie. La muestra MZ03-8H fue recolectada de una grieta de retracción con escurrimiento de agua, con formaciones de aspecto mucoso de coloración marrón y amarilla sobre el sustrato de roca de lava. De esta zona de muestreo se aislaron 18 cepas bacterianas (Tabla 4.7.), la mayoría de ellas relacionadas con el suelo, lo que puede ser debido a la filtración a través de la grieta. Además, algunas de las especies más próximas a las cepas aisladas en este estudio fueron aisladas de lugares tan dispares como la pasta de soja fermentada o tejido animal. La mitad de las bacterias identificadas fueron aisladas tras el sometimiento de la muestra a choque térmico por congelación de la misma a -80 °C, de manera que favoreciera el desarrollo de bacterias raras (Bredholdt y col., 2007; Ulanova y Goo, 2015).

El filo con mayor abundancia en la muestra fue *Firmicutes*, donde seis de los ocho aislados clasificados en este grupo se identificaron con el género *Bacillus*, seguido de dos *Paenibacillus*. La procedencia del aislamiento original de estas bacterias fue mayoritariamente de suelos. Cabe destacar la cepa MZ0368H, cuya identificación no se puede confirmar únicamente a través del análisis del gen ARNr 16S puesto que comparte similitud con cuatro cepas del grupo *Bacillus cereus*. El siguiente grupo más representativo fue el filo *Proteobacteria* con seis cepas aisladas. Este es un grupo muy diverso donde se aislaron los géneros *Pandoraea*, *Sphingobium*, *Cupriavidus*, *Blastomonas* y *Sphingomonas*, en dos ocasiones. El grupo menos abundante de la muestra fue *Actinobacteria* con cuatro cepas aisladas, todas ellas pertenecientes al género *Streptomyces*.

Por otra parte, se encontraron en MZ03-8H especies de *Bacillus* no identificadas en muestras anteriores. *B. paralicheniformis* es una bacteria desnitrificante productora de antibióticos del tipo péptidos policíclicos, que también ha sido motivo de estudio para entender los mecanismos putativos de resistencia a antibióticos (Collins y col., 2016; Agersø y col., 2018). *B. thuringiensis* es un conocido agente utilizado en mecanismos de control biológico por la producción de compuestos insecticidas y antibióticos (Jamoussi, 2013; Khaleghi y col., 2019). Existen referencias que sitúan a esta bacteria en ambientes subterráneos participando en procesos de biomineralización (Baskar, 2006; Klusaite y col., 2016). *B. nakamurai* ha sido descubierta recientemente y está siendo utilizada en distintos sectores industriales (Telebi y col., 2018; Sanders y col., 2019).

Dos cepas aisladas fueron identificadas como *Paenibacillus polymyxa*. Es una rizobacteria con cepas capaces de producir antimicrobianos, antivirales y antifúngicos, entre otros, así como participar en procesos de biomineralización a través de la solubilización de carbonato cálcico (Huang y Ahmed, 2015; Natarajan, 2016).

El género *Sphingobium* surgió de la división en cuatro grupos de *Sphingomonas* (Takeuchi y col., 2001). Es un grupo especializado en la degradación de compuestos xenobióticos, PAH y otros. De hecho, *S. lactosutens* fue aislado en un suelo donde se vertían hexaclorociclohexanos (Kumari y col., 2009).

Blastomonas es un género con pocas especies que originalmente se incluían en el género *Blastobacter*. Precisamente fue *Blastomonas natatoria* el primer espécimen transferido al nuevo grupo (Sly y Cahill, 1997). Se trata de una especie fotosintética de la que recientemente se ha documentado su intervención en determinadas infecciones en el ser humano (Soler, 2018).

La especie *Sphingomonas ginsenosidimutans* tiene adaptado su metabolismo para transformar ginsenosidos, los componentes activos del ginseng (Choi y col., 2010).

Streptomyces sanglieri fue descrita junto con *S. aureus* y *S. laceyi* como especies estrechamente relacionadas con *S. griseus* (Manfio, 2003). Es una bacteria estudiada por producir compuestos antibióticos y antitumorales

(Hotzel y col., 2003). *S. rhizosphaerihabitans* es una especie descrita en 2016 a partir de muestras de suelos de bosques de bambú (Lee y Hyo-Jin, 2016).

Tabla 4.7. Bacterias presentes en la “Fuente de La Canaria”. Aisladas de la muestra MZ03-8H

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ039H	LR584272	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /Pasta de soja fermentada (LBMN01000156)	99.53
MZ0342H	LR584292	<i>Bacillus clausii</i> /Suelos (X76440)	99.40
MZ0311H	LR584275	<i>Bacillus clausii</i> /Suelos (X76440)	98.74
MZ0369H	LR584345	<i>Bacillus thuringiensis</i> /Tejido animal (ACNF01000156)	99.76
MZ0368H	LR584344	¹ <i>Bacillus sp</i> /Entornos marinos	100
MZ0367H	LR584343	<i>Bacillus nakamurai</i> /Suelos (LSAZ01000028)	100
MZ0379H1	LR584351	<i>Paenibacillus polymyxa</i> /Suelos (AFOX01000032)	99.76
MZ0379H2	LR584350	<i>Paenibacillus polymyxa</i> /Suelos (AFOX01000032)	99.75
MZ0344H	LR584293	<i>Pandora norimbergensis</i> /Capa óxica de sedimento sulfuroso (AY268174)	99.41
MZ03780H	LR584269	<i>Sphingobium lactosutens</i> /Suelo vertedero (ATDP01000055)	98.97
MZ03880H	LR584270	<i>Blastomonas natatoria</i> /Agua (AB024288)	99.88
MZ031380H	LR584277	² <i>Sphingomonas sp</i>	99.17
MZ031080H	LR584273	<i>Sphingomonas ginsenosidimutans</i> /Cultivos (HM204925)	98.64
MZ031580H	LR584279	<i>Cupriavidus necator</i> /Suelos (CP002878)	100
MZ031480H	LR584278	³ <i>Streptomyces sp.</i>	99.89
MZ03980H3	LR584271	<i>Streptomyces sanglieri</i> /Suelos granja (AB249945)	100
MZ031280H	LR584276	³ <i>Streptomyces sp.</i>	99.88
MZ031180H	LR584274	<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i> /Suelos bosques (HQ267983)	100

¹ Cepa que comparte similitud con cuatro especies: *Bacillus albus* (MAOE01000087), *Bacillus luti* (MACI01000041), *Bacillus tropicus* (MACG01000025) y *Bacillus wiedmannii* (LOBC01000053). Pertenecen al grupo de *Bacillus cereus*.

² Cepa que comparte similitud con dos especies: *Sphingomonas trueperi* (X97776), aislado originalmente en suelos y *Sphingomonas puitosa* (AJ243751), aislado originalmente en agua eutrofizada.

³ Cepa que comparte similitud con tres especies: *Streptomyces yatensis* (AB249962), aislada originalmente en suelos ultramáficos, *Streptomyces sporoclivatus* (AB249934), aislamiento original desconocido y *Streptomyces antimycoticus* (AB184185), aislada originalmente en suelo compost.

4.1.2.6 IDENTIFICACIONES DE LA MUESTRA MZ03-10J

La última muestra analizada del tubo de lava “Fuente de La Canaria”, denominada MZ03-10J, presentó unas condiciones similares a MZ03-7G, con una importante humedad y caracterizada por presentar un aspecto similar a

un gel arcilloso con colonias blancas sobre el sustrato de roca de lava. En la Tabla 4.8 se presenta la identificación de las 17 cepas bacterianas identificadas en los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, por orden de abundancia.

El género *Bacillus* volvió a ser el más abundante dentro del filo *Firmicutes*, donde la especie *Bacillus mycoides*, también con abundancia destacada en la muestra MZ03-7G, aparecía representada por dos cepas aisladas. También se identificaron dos cepas de *Bacillus butanolivorans*. Todas las especies identificadas en este género fueron originalmente aisladas en distintos tipos de suelos.

Dentro del filo *Actinobacteria*, se aislaron tres cepas pertenecientes al género *Rhodococcus*, sin poder llegar a determinar la especie más cercana puesto que compartían similitud con *R. qingshengii* y *R. degradans*.

Las dos proteobacterias identificadas en el análisis fueron clasificadas en los géneros *Enterobacter* y *Acinetobacter*, y las bacterias, más próximas a las cepas aisladas en este estudio, fueron originalmente aisladas de suelos y agua de pozo.

Se identificaron dos cepas clasificadas en el género *Chryseobacterium*, dentro del filo *Bacteroidetes*, con lugares de aislamiento completamente antagónicos. De esta forma, MZ03-10J y MZ03-7G difieren del resto de muestras al presentar cepas cuyo análisis del gen ARNr 16s ha identificado a bacterias más cercanas, filogenéticamente hablando, con lugares de aislamiento alejados de los ambientes subterráneos.

Además de *Bacillus mycoides*, de esta muestra se aislaron dos cepas identificadas como *B. butanolivorans*, especie estudiada en estrategias de biorremediación por su capacidad para degradar *n*-butanol, y que ha mostrado la habilidad de biomineralizar silicatos (Kuisiene y col., 2008; Vojtkova, 2017). *B. drentensis* como otras especies del mismo género, tiene la capacidad de degradar PAH y movilizar metales pesados en ambientes contaminados (Kim y col., 2014; Evangeline, 2018). No existen referencias documentadas más allá de las descripciones de *B. solisilvae* y *B. mesonae*.

El género *Solibacillus* es un grupo con solo tres especies descritas hasta el momento y proviene de una reclasificación en 2016 de *Bacillus isronensis* en *Solibacillus isronensis* (Mual y col., 2016). Se ha mostrado interés

en miembros de este grupo por, al igual que *Bacillus*, su utilidad en procesos de degradación en ambientes contaminados (Markande y Nerurkar, 2016a y b).

Nonomuraea es un género considerado como actinobacterias raras, lo cual ha abierto la puerta al descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos de interés biotecnológico (Sungthong y Nakaew, 2015). *N. endophytica* es una bacteria endofítica originalmente identificada en las raíces de *Artemisia annua*. (Li y col., 2011).

Enterobacter es un género Gram negativo, anaerobio facultativo, principalmente conocido por ser causante de múltiples enfermedades en mamíferos (Cunningham y Leber, 2018). *E. soli* es una bacteria degradadora de lignina (Manter y col., 2011).

Acinetobacter dispersus, al igual que otras especies del mismo género, desarrolla mecanismos de resistencia a antibióticos, en este caso a β -lactámicos (Tian y col., 2018).

El género *Chryseobacterium* es el único grupo de *Bacteroidetes* aislado en la presente tesis. Gram negativo, se localiza principalmente en suelos y aguas, algunas especies han sido reconocidas por su actividad patogénica en seres humanos (Kirby y col., 2004). *C. joostei* es una bacteria con cepas que han presentado características probióticas y capacidad para degradar pesticidas (Krishna y Ligy, 2008; Jinendiran y col., 2017).

Tabla 4.8. Bacterias presentes en la “Fuente de La Canaria”. Aisladas de la muestra MZ03-10J

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ0393J	LR584359	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	100
MZ03102J	LR584361	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	100
MZ03103J	LR584362	<i>Bacillus butanolivorans</i> /Suelos (LGYA01000001)	100
MZ0375J	LR584349	<i>Bacillus butanolivorans</i> /Suelos (LGYA01000001)	99.48
MZ03100J1	LR584384	<i>Bacillus drentensis</i> /Prados (AJ542506)	100
MZ0373J	LR584347	<i>Bacillus solisilvae</i> /Suelos bosques (KJ733017)	99.28
MZ03100J2	LR584383	<i>Bacillus mesonae</i> /Raíces de <i>Mesona chinensis</i> (KV440949)	99.36
MZ0385J	LR584354	¹ <i>Solibacillus</i> sp.	100
MZ03124J	LR584367	² <i>Paenibacillus</i> sp.	99.64
MZ0398J	LR584360	³ <i>Rhodococcus</i> sp.	100
MZ0398J1	LR584371	³ <i>Rhodococcus</i> sp.	100
MZ0398J2	LR584372	³ <i>Rhodococcus</i> sp.	100

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ03117J	LR584382	<i>Nonomuraea endophytica</i> /Artemisia annua (GU367158)	99.30
MZ03108J	LR584364	<i>Enterobacter soli</i> /Suelos (LXES01000062)	99.08
MZ0386J	LR584355	<i>Acinetobacter dispersus</i> /Agua de pozo (KB850049)	99.64
MZ03107J	LR584363	⁴ <i>Chryseobacterium</i> sp.	99.83
MZ0384J	LR584370	<i>Chryseobacterium joostei</i> /Lechería (jgi.1096615)	99.75

¹ Cepa que comparte similitud con dos especies: *Solibacillus isronensis* (AMCK01000046), aislada originalmente en atmósfera superior y *Solibacillus kalamii* (KT763359), aislada originalmente en la Estación Espacial Internacional.

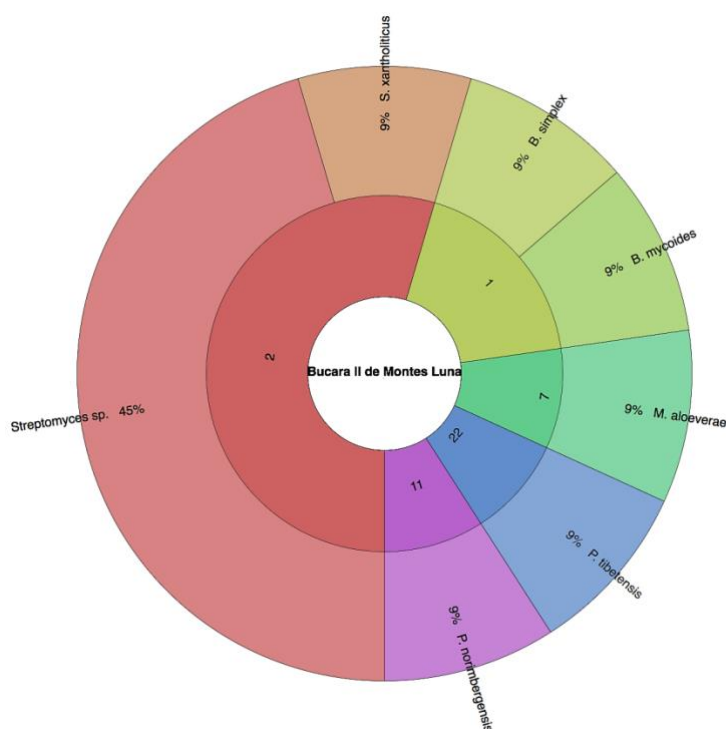
² Cepa que comparte similitud con cuatro. especies: *Paenibacillus peoriae* (AJ320494), aislada originalmente en pasta de papel, *Paenibacillus polymyxa* (AFOX01000032), aislada originalmente en suelos, *Paenibacillus brasilensis* (AF273740), aislada originalmente en rizosfera de maíz y *Paenibacillus jamilae* (AJ271157), aislada originalmente en alpechín.

³ Cepas que comparten similitud con dos especies: *Rhodococcus qingshengii* (LRRJ01000016), aislada originalmente en campos de hortalizas contaminadas con carbendazima. y *Rhodococcus degradans* (JQ776649), aislada originalmente en suelos contaminado por restos orgánicos.

⁴ Cepa que comparte similitud con dos especies: *Chryseobacterium oncorhynchi* (FN674441), aislada originalmente en *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris) y *Chryseobacterium rhizoplanae* (KP033261), aislada originalmente en Rizoplano.

4.1.3 CEPAS AISLADAS DEL TUBO DE LAVA “BÚCARA II DE MONTES LUNA”: MZ26-11K

El último tubo de lava analizado en el municipio Villa de Mazo ha sido el “Búcara II de Montes Luna”, estudiándose para cultivo y aislamiento de cepas bacterianas la muestra MZ26-11K (Fig. 4.3 y Tabla 4.9). Esta cueva volcánica se caracteriza por un sustrato formado por unos depósitos color rosa que se intercalan con formaciones de moonmilk sobre roca de lava. Se aislaron un total de 11 cepas bacterianas, clasificadas en su mayoría en el filo *Actinobacteria*. De las siete cepas clasificadas en este grupo, seis fueron identificadas como *Streptomyces*. De estas, cinco compartieron similitud con cuatro cepas que conforman un subgrupo filogenético dentro de este género (Lanoot y col., 2005). Dos cepas se han clasificado como *Bacillus*, dentro del filo *Firmicutes*. Por último, se han clasificado como *Proteobacteria* dos cepas aisladas en esta muestra. Los géneros identificados en este filo han sido *Paracoccus* y *Pandoraea*.



1. *Bacillus* 2. *Streptomyces* 7. *Micrococcus* 11. *Pandorea*
 22. *Paracoccus*

Figura 4.3. Distribución de cepas bacterianas aisladas en el tubo de lava “Búcara II de Montes Luna”.

Streptomyces xantholiticus, como gran parte de especies descritas del género *Streptomyces*, es un productor de antibióticos y parece que podría ser utilizado como agente de control biológico (Kumar, 2005; Sahu, 2007).

Micrococcus alcoverae es una bacteria halotolerante endofítica, como otras ya descritas anteriormente. La vegetación superficial y la infiltración podrían ser las causas de encontrar a esta bacteria en el interior del tubo de lava.

El género *Paracoccus* contiene especies Gram negativas, principalmente descritas a partir de muestras ambientales, también en cuevas como *P. cavernae* (Dominguez-Monino y col., 2016). *P. tibetensis* es una bacteria desnitrificante que, formando parte de un consorcio de bacterias, se observó su importancia degradando materia orgánica en la fase de fangos activos de una planta residual (Ding y col., 2017).

Tabla 4.9. Bacterias presentes en la “Búcara II de Montes Luna”. Aisladas de la muestra MZ26-11K

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
MZ2640K	LR584338	<i>Streptomyces xantholiticus</i> /Desconocido, Rusia (AB184349)	98.80
MZ2639K	LR584337	¹ <i>Streptomyces sp.</i>	100
MZ2637K	LR584336	¹ <i>Streptomyces sp.</i>	100
MZ2634K	LR584334	¹ <i>Streptomyces sp.</i>	100
MZ2635K	LR584335	¹ <i>Streptomyces sp.</i>	100
MZ2638K	LR584368	¹ <i>Streptomyces sp.</i>	99.84
MZ2688K	LR584358	<i>Micrococcus aloeverae</i> /Aloe vera (KF524364)	99.74
MZ26123K	LR584366	<i>Bacillus simplex</i> /Suelos (BCVO01000086)	97.30
MZ2631K	LR584369	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	100
MZ2687K	LR584356	<i>Paracoccus tibetensis</i> /Permafrost (DQ108402)	98.24
MZ2674K	LR584348	<i>Pandoraea norimbergensis</i> /Capa óxica de sedimento sulfuroso (AY268174)	99.55

¹ Cepas que comparten similitud con cuatro especies: *Streptomyces xanthophaeus* (JOFT01000080), aislada originalmente en suelos, *Streptomyces spororaveus* (AJ781370), aislamiento original desconocido, *Streptomyces nojiriensis* (AJ781355), aislamiento original en Sedimento del lago Nojiri, Japón y *Streptomyces avidinii* (AB184395), aislamiento original desconocido.

4.1.4 CEPAS AISLADAS DEL TUBO DE LAVA “CUEVA HONDA DEL BEJENADO”: EP01-6F

El tubo de lava “Cueva Honda del Bejenado” (EP01) se localiza dentro del Parque Nacional del Taburiente, y no se ve afectado por actividad humana superficial. En sus paredes y techos se aprecian formaciones de minerales secundarios, especialmente coraloides con base de calcita y haloisita de coloración amarilla, que caracterizan a este tubo de lava.

Solo una muestra de esta cueva volcánica fue analizada para la identificación de bacterias mediante cultivo (Fig. 4.4 y Tabla 4.10), obteniéndose un total de nueve cepas aisladas, dos de ellas (*Amycolatopsis*) tras sometimiento de la muestra a -80 °C. A nivel de filo, se clasificaron cuatro cepas en el grupo *Proteobacteria*, tres en *Firmicutes* y dos en *Actinobacteria*. Cabe destacar la variedad taxonómica identificada a nivel de género y especie en los grupos *Proteobacteria* y *Firmicutes*, mientras que las cepas clasificadas en el filo *Actinobacteria* podrían pertenecer no solo al mismo género, sino también a la misma especie. La procedencia de la mayor parte de las

bacterias analizadas tiene como origen suelos o las rizosferas de diferentes especies vegetales.

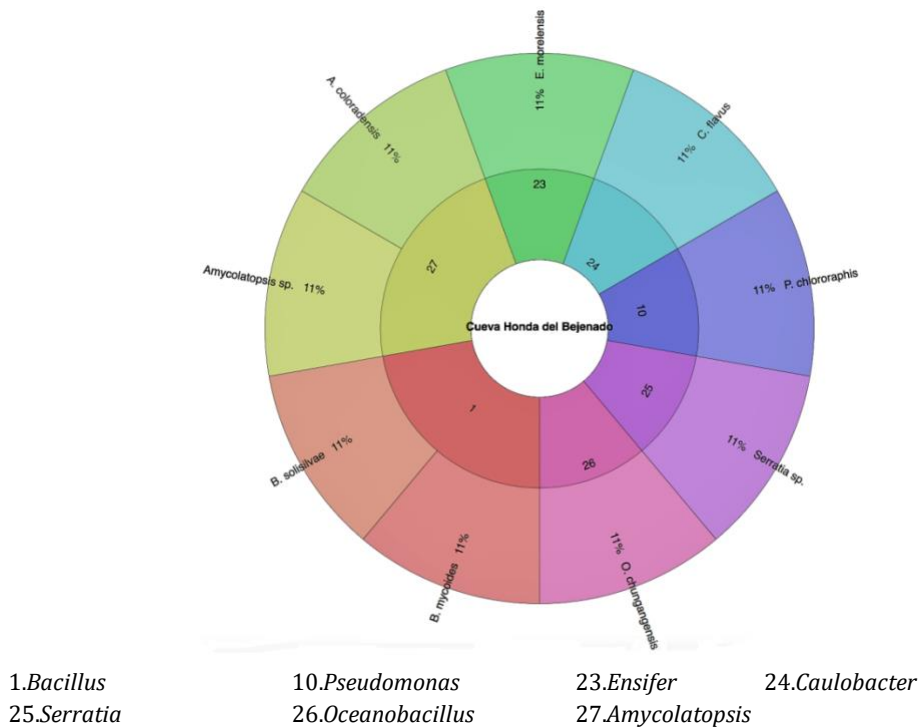


Figura 4.4. Distribución de cepas bacterianas aisladas en el tubo de lava "Cueva Honda del Bejenado".

Ensifer, también llamado *Sinorhizobium*, es un género Gram negativo de rizobacterias, de manera que se han podido documentar especies con mayor o menor disposición a resistir elevadas concentraciones de sales, o con capacidad para resistir contaminaciones por metales pesados (DiCenzo y col., 2018). *E. morelensis* es una sinonimia de *E. adhaerens*, que presenta características calcificantes, entre otras comunes de otras especies clasificadas en este género (Hatayama y col., 2018).

El género *Caulobacter* es un grupo principalmente ambiental, donde la mayoría de las especies descritas provienen de suelos y aguas. Algunas bacterias han sido asociadas a la formación de depósitos de ferromanganesos localizados en cuevas (Cunningham y col., 1995; Lozano y Rossi, 2012). *C. flavus* es una bacteria que produce una pigmentación amarilla (Wei y col.,

2015), de forma que el crecimiento de esta bacteria sobre las paredes y techos del tubo de lava podría ser parte de los procesos biogeoquímicos que, entre otros, le darían la coloración amarilla.

Pseudomonas chlororaphis subsp. chlororaphis es una subespecie de *P. chlororaphis* perteneciente al subgrupo con el mismo nombre. Los miembros de este subgrupo son rizobacterias utilizadas principalmente como agente de control biológico por su capacidad para contener hongos patógenos de determinadas plantas (Velivelli y col., 2014).

Serratia es un género Gram negativo con variedad de patógenos oportunistas causantes de distintas enfermedades en humanos. Es un grupo que ha sido identificado en numerosos ambientes subterráneos participando en procesos de biomineralización (Rusznyák y col., 2012; Tomova y col., 2013). *S. myotis* fue descrita como una de las bacterias causantes del síndrome de nariz blanca en murciélagos que habitan en cuevas de la República Checa (García-Fraile y col., 2015). También ha sido identificada en el capítulo 3 de la presente tesis mediante el estudio de las comunidades de bacterias metabólicamente activas de la misma muestra EP01-6F.

Oceanobacillus es un género descrito por Lu y colaboradores (2001) tras la identificación del primer miembro de este grupo en las profundidades del océano. De hecho, la mayor parte de las especies aquí clasificadas han sido aisladas a partir de muestras de sedimentos oceánicos u otros ambientes relacionados, además de compartir características fisiológicas como la halotolerancia y alcalofilia. *O. chungangensis* presenta estas particularidades. La proximidad del océano al tubo de lava, unido a la formación de esporas de esta bacteria para su reproducción asexual, podría haber favorecido la dispersión y colonización de estos ecosistemas.

Bacillus solisilvae es una bacteria ambiental, propia de suelos boscosos. De reciente identificación, no existe referencias documentadas más allá de su descripción (Pan y col., 2017).

Amycolatopsis se constituye como uno de los géneros, después de *Streptomyces*, con un potencial metabolismo productor de biocompuestos de interés científico e industrial. Antibióticos, inmunosupresores, o antitumorales son algunos de los metabolitos secundarios que *Amycolatopsis* es capaz de producir (Kumari y col., 2016). *A. coloradensis* es una bacteria

productora del antibiótico glicopeptídico avoparcina, eficaz contra bacterias Gram positivas (Labeda, 1995). Además, difunde un pigmento amarillo en casi todos los medios de cultivo utilizados en su descripción, por lo que su actividad metabólica podría ser determinante en la pigmentación del tubo de lava donde fue aislada.

Tabla 4.10. Bacterias presentes en la “Cueva Honda del Bejenado”. Aisladas de la muestra EP01-6F

Cepa	Nº Acceso	Identificación/Fuente de aislamiento (Nº Acceso)	Similitud (%)
EP66F	LR584302	<i>Ensifer morelensis</i> /Raíces de <i>Leucaena leucocephala</i> (AY024335)	99.78
EP93F	LR584316	<i>Caulobacter flavus</i> /Rizosfera (KR086403)	98.99
EP96F2	LR584319	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> /Placa de cultivo contaminada (BCZX01000031)	99.84
EP91F2	LR584315	¹ <i>Serratia</i> sp.	98.21
EP95F2	LR584317	<i>Oceanobacillus chungangensis</i> /Duna de arena (JX233492)	98.81
EP96F1	LR584318	<i>Bacillus mycoides</i> /Suelos (ACMU01000002)	99.84
EP71F1	LR584346	<i>Bacillus solisilvae</i> /Suelo de bosque (KJ733017)	99.48
EPBL80F	LR584380	² <i>Amycolatopsis</i> sp.	99.67
EPST80F	LR584381	<i>Amycolatopsis coloradensis</i> /Suelos (MQUQ01000038)	98.62

¹ Cepa que comparte similitud con tres especies: *Serratia myotis* (KJ739884), aislada originalmente en Murciélagos que hibernan en cuevas., *Serratia plymuthica* (AJ233433), aislamiento original desconocido y *Serratia quinivorans* (AJ279045), aislada originalmente en suelos.

² Cepa que comparte similitud con dos especies: *Amycolatopsis thailandensis* (NMQT01000085), aislada originalmente en Suelos de parque natural en Tailandia y *Amycolatopsis coloradensis* (MQUQ01000038), aislada originalmente en suelos.

4.1.5 DESCRIPCIÓN DE NUEVAS ESPECIES BACTERIANAS DEL GÉNERO *STREPTOMYCES*

El género *Streptomyces* fue propuesto por Waksman y Henrici en 1943, y no solo es el grupo tipo de la familia *Streptomycetaceae*, además es el grupo más representativo del filo *Actinobacteria* con 848 especies y 38 subespecies descritas (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>). También se presenta como uno de los grupos más abundantes de bacterias constituyendo el 5% de las más de 16.000 especies descritas (<http://www.bacterio.net/>).

Este género resulta especialmente característico por varias razones. Su desarrollo vegetativo genera micelios ramificados que esporulan, razón por la cual originalmente se consideró un grupo de transición entre hongos y bacterias (Miyadoh, 1997). Es común la producción de pigmentos, según las condiciones del cultivo, responsables de la coloración del micelio. Microorganismos aeróbicos, quimiorganotrofos y de metabolismo oxidativo, son productores de numerosos metabolitos secundarios, especialmente utilizados en medicina (Hopwood, 2007). De forma general, su crecimiento óptimo se sitúa entre los 25-30° C, aunque existen especies termófilas. El rango de pH óptimo para su crecimiento varía entre 6,5-8 (Kämpfer, 2006). Al igual que el resto de bacterias del filo *Actinobacteria*, este grupo presenta estructura Gram positiva. A nivel genómico, presenta un cromosoma lineal y un elevado contenido GC, que varía entre el 69% y el 78% (Barka, y col., 2015).

4.1.5.1 DESCRIPCIÓN DE MZ0467C

La cepa MZ0467C (Fig. 4.5) se aisló de los espeleotemas de color amarillo-anaranjado presentes en el tubo de lava “Cueva del Llano de los Caños”, en el municipio de Villa de Mazo. El análisis filogenético basado en el alineamiento y comparación de la secuencia del gen ARN ribosómico 16S con las secuencias presentes en la base de datos EZBiocloud, clasificó a esta cepa dentro del género *Streptomyces*.

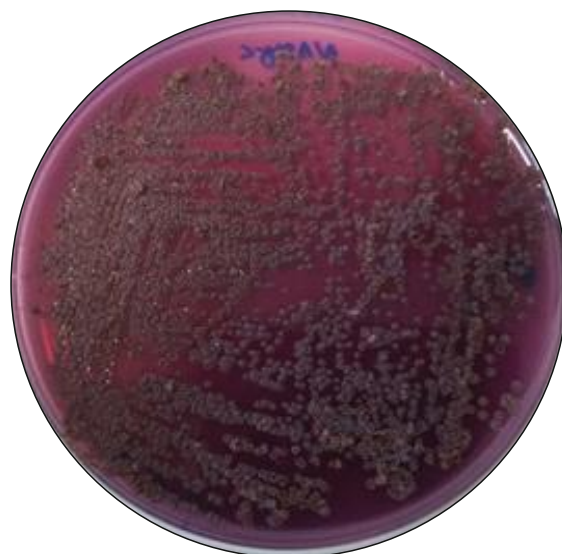


Figura 4.5. Cultivo de MZ0467C en placa con agar nutritivo, magnesio y glicerol. Micelio de color marrón-violeta con difusión de pigmento violeta.

La cepa de estudio presentó porcentajes de similitud del 99,78%, 99,71%, 99,63%, 99,41% y 99,25% para *Streptomyces aureus* NBRC 100912^T, *Streptomyces durmitorensis* MS405^T, *Streptomyces longisporoflavus* NBRC 12886^T, *Streptomyces kanamyceticus* NBRC 13414^T y *Streptomyces rosealbus* YIM 31634^T, respectivamente. El resto de cepas más cercanas identificadas por EzBiocloud se mantuvieron por debajo del umbral del 98,7% fijado por Yarza y colaboradores (2014), indicativo de bacterias susceptibles de identificarse como nuevas especies.

Se generó el árbol filogenético de la cepa MZ0467C para determinar la posición con respecto a las cepas más próximas según el análisis de identificación realizado con la base de datos EzBiocloud (Fig. 6). Se pudo observar que la cepa de estudio se encontraba más estrechamente relacionada con *S. kanamyceticus* y *S. aureus*. Sin embargo, no se agruparon en un mismo clado, situándose en ramas diferenciadas.

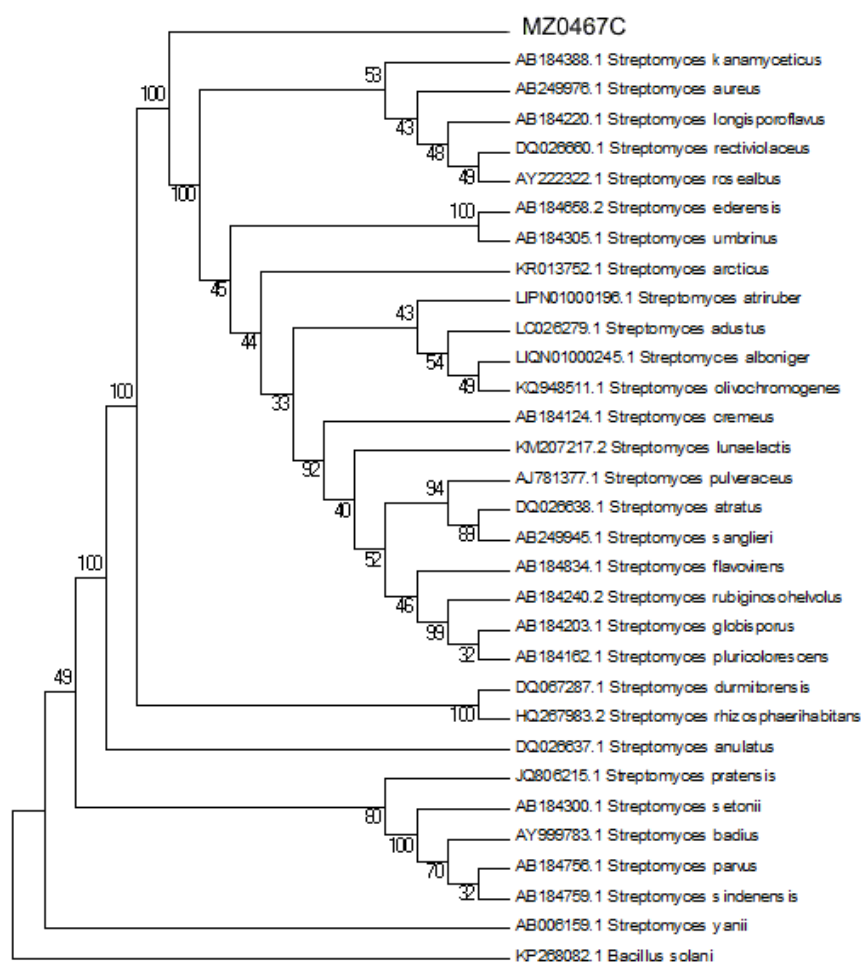


Figura 4.6. Árbol filogenético realizado con el método Neighbor joining y un análisis de bootstrap de 1000. Se tomaron las secuencias más próximas de acuerdo al análisis de identificación realizado con la base de datos EZBiocloud.

Si bien las similitudes obtenidas con las especies filogenéticamente más próximas estaban por encima del umbral marcado para establecer la identificación a nivel de especies, presentó la mayor similitud con *S. aureus*, clasificada en el grupo de *S. griseus*, reconocido como uno de los grupos más complejos desde el punto de vista taxonómico. Este hecho unido a la morfología y difusión de pigmento por parte de MZ0467C difería de lo apreciado en la bibliografía relacionada con la especie tipo de *S. aureus*, lo que aconsejó un segundo estudio más profundo del perfil alélico de los genes multilocus (MLSA) para la identificación de *Streptomyces* (Guo y col., 2008).

4.1.5.2 DESCRIPCIÓN DE MZ0337C2 Y MZ0348B

La descripción de ambas cepas se realizó de forma conjunta a pesar de ser dos bacterias aisladas en dos muestras diferentes tomadas del mismo tubo de lava, “Fuente de la Canaria”, también en el municipio de Villa de Mazo. La razón fue la identificación de las mismas tres especies más próximas en ambas cepas de estudio que, si bien presentaban características morfológicas distintas, pudiera darse el caso de estar frente a dos cepas de la misma especie. MZ0337C2 (Fig. 4.7 (A) derecha y (B) izquierda) proviene de la muestra caracterizada por la formación de mucolitos de color crema, mientras que MZ0348B (Fig. 4.7 (A) izquierda y (B) derecha) se aisló de una muestra caracterizada por la colonización de tapetes microbianos sobre el sustrato de roca volcánica. El análisis filogenético basado en el alineamiento y comparación de la secuencia del gen ARN ribosómico 16S con las secuencias presentes en la base de datos EZBiocloud clasificó a ambas cepas dentro del género *Streptomyces*.

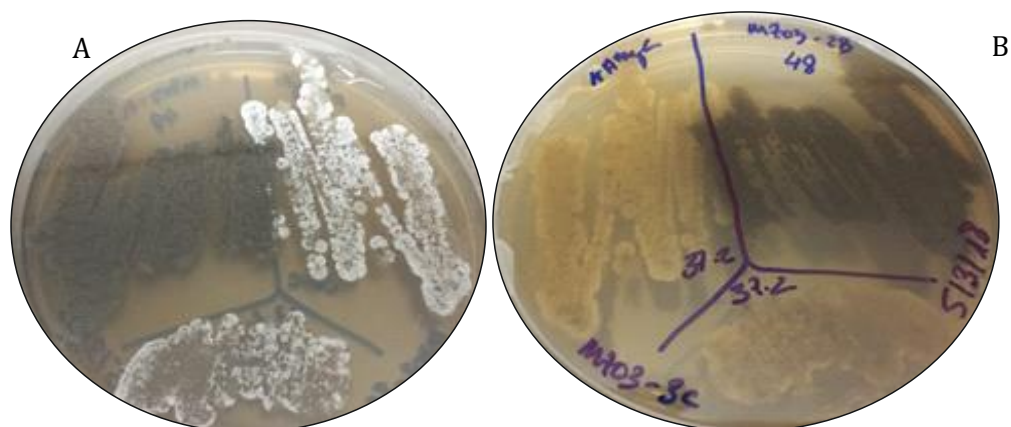


Figura 4.7. MZ0337C2, de color crema (B, izquierda y abajo) y esporulación blanca (A, derecha y abajo), y MZ0348B, de color oscuro-negro sin esporulación (A, izquierda; B, Derecha). Cultivo en placa con agar nutritivo, magnesio y glicerol. Sin difusión de pigmento.

MZ0337C2 presentó similitudes del 98,71% con *Streptomyces palmae* CMU-AB204^T, 98,35% con *Streptomyces ramulosus* NRRL B-2714^T y *Streptomyces catenulae* NRRL B-2342^T, 98,28% con *Streptomyces lilacinus* NRRL B-1968^T y 98,27% con *Streptomyces abikoensis* NBRC 13860^T. En el caso de MZ0348B, se obtuvo un 98,74% de similitud con *Streptomyces*

palmae AB204^T, un 98,52%, con *Streptomyces catenulae* y un 98,37% con *Streptomyces ramulosus* NRRL B-2714^T, *Streptomyces libani* sub. *libani* NBRC 13452^T y *Streptomyces nigrescens* NBRC 12894^T.

El árbol filogenético realizado utilizando las secuencias de las especies más cercanas de acuerdo al análisis de identificación con la base de datos EzBiocloud generó un ramal compuesto por las dos cepas de estudio. Las especies más próximas fueron *S. palmae*, *S. ramulosus* y *S. catenulae*, siguiendo una tendencia similar a la presentada en los resultados de identificación de especies con la base de datos.

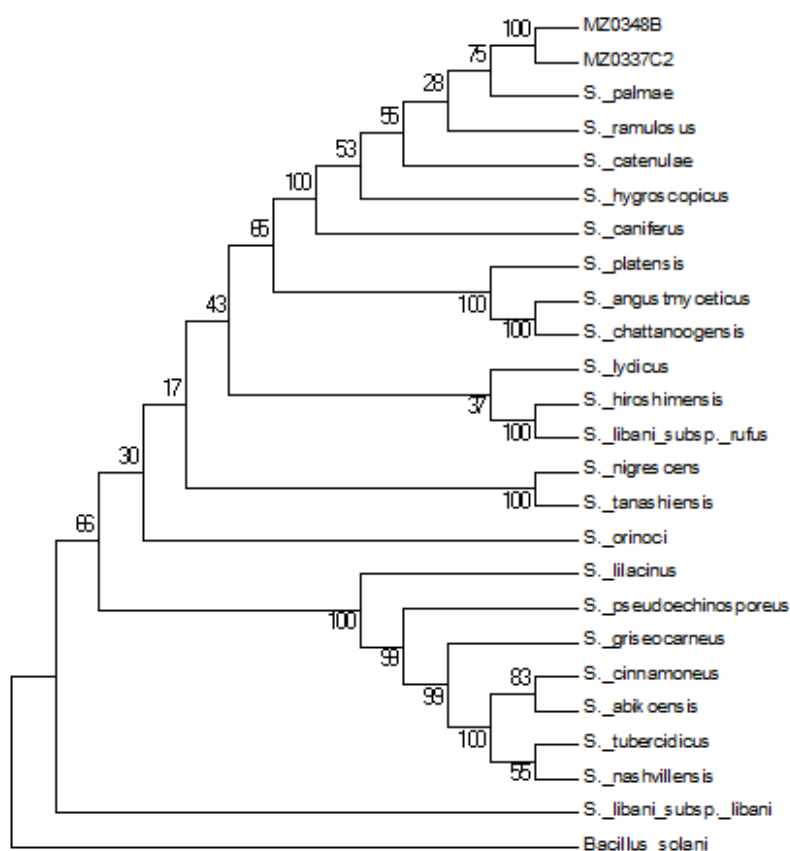


Figura 4.8. Árbol filogenético realizado con el método Maximum parsimony con un análisis de bootstrap igual a 1000. Se tomaron las secuencias más próximas de acuerdo al análisis de identificación realizado con la base de datos EZBiocloud.

Debido a la similitud observada por MZ0337C2 y MZ0348B frente a *S. palmae*, al límite del 98,7% fijado por Yarza y colaboradores (2014) para determinar una nueva especie, así como la estrecha afinidad entre las secuencias de las dos cepas de *Streptomyces* a estudiar, se decidió realizar el estudio MLSA para obtener un estudio genético más profundo que aportara información adicional para ayudar a identificar las bacterias de estudio.

4.1.5.3 MLSA: ANÁLISIS DE SECUENCIAS MULTILOCUS

Los resultados derivados de analizar las secuencias multilocus de las cepas aisladas susceptibles de ser nuevas especies se describen en la Tabla 4.11. Las cepas descritas como MZ0337C2, MZ0348B y MZ0467C fueron identificadas inicialmente como especies del género *Streptomyces* a través del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S. Si bien los índices de similitud con las cepas más cercanas incluidas en las bases de datos de EzBiocloud y NCBI se encontraban por encima del 98,7% fijado como umbral para discriminar entre especies. No obstante, debido a que el género *Streptomyces* comprende un vasto grupo de especies identificadas en este género, y a las dudas que surgieron tras consultar la bibliografía relacionada con la identificación de las cepas, se decidió realizar un estudio genético más exhaustivo, llevando a cabo el análisis de las secuencias multilocus (MLSA), que comprenden los genes ARNr 16S, atpD, gyrB, recA, rpoB y trpB. Las secuencias de dichos genes fueron enfrentadas a la base de datos NCBI y a la base de datos específica “*Streptomyces* MLST Databases”.

Tabla 4.11. Análisis de secuencias multilocus (MLSA) para la identificación de especies de *Streptomyces*.

Aislado	MZ0467C	MZ0337C2	MZ0348B
Gen			
ARNr 16S	<i>S. aureus</i>	<i>S. palmae</i>	<i>S. palmae</i>
atpD	<i>S. kanamyceticus</i>	<i>S. catenulae</i>	<i>S. catenulae</i>
gyrB	<i>S. kanamyceticus</i>	<i>S. catenulae</i>	<i>S. catenulae</i>
recA	<i>S. kanamyceticus</i>	<i>S. catenulae</i>	<i>S. catenulae</i>
rpoB	<i>S. spiroverticillatus</i>	<i>S. ramulosus</i>	<i>S. ramulosus</i>
trpB	<i>S. kanamyceticus</i>	<i>S. catenulae</i>	<i>S. catenulae</i>

El estudio de los perfiles alélicos dio como resultado identificaciones a diferentes especies. Así, en el caso de MZ0467C (Fig. 4.6), el análisis del gen

ARNr 16S concluyó que la especie más próxima era *Streptomyces aureus*, sin embargo, *Streptomyces kanamyceticus* fue la especie más cercana en cuatro de los seis genes estudiados, *atpD*, *gyrB*, *recA* y *trpB*. *Streptomyces spiroverticillatus* fue la cepa más cercana en el caso del gen *rpoB*. No obstante, esta especie no aparece en la lista de las 30 especies más cercanas de acuerdo al análisis de identificación con el gen ARNr 16S.

Tanto para MZ0337C2 como para MZ0348B, dos cepas con igual identificación de los perfiles alélicos pero distintas en apariencia por su textura y color, aisladas en diferentes muestras del mismo tubo de lava, la especie más cercana para el análisis del gen ARNr 16S fue *Streptomyces palmae*, mientras que la identificación de los genes *atpD*, *gyrB*, *recA* y *trpB* se correspondieron con *Streptomyces catenulae*. *Streptomyces ramulosus* fue la especie más próxima tras analizar la secuencia del gen *rpoB*.

Por tanto, dada la disparidad de resultados genéticos, la determinación de nueva especie se resolvería secuenciando y analizando los genomas completos de las cepas de estudio para su comparación con *S. aureus* y *S. kanamyceticus*, en el caso de la cepa MZ0467C, y *S. palmae* y *S. catenulae*, para MZ0337C2 y MZ0348B. En el primer caso se tomó la decisión de utilizar las dos citadas especies de *Streptomyces* debido a los resultados obtenidos con el análisis del gen ARNr 16S, el resultado del árbol filogenético y los resultados del estudio del perfil alélico MLSA, donde la mayor parte de los genes analizados se identificaban con el perfil de *S. kanamyceticus*. En el segundo caso se siguió la misma praxis, donde los diferentes resultados mostraban una mayor proximidad con las dos especies citadas.

4.1.5.4 ENSAYOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS Y QUIMIOTAXONÓMICOS

PARA LA DETERMINACIÓN DE NUEVA ESPECIE BACTERIANA

Cepa MZ0467C

MZ0467C presentó la formación de un micelio aéreo y reverso de color marrón en el medio de aislamiento NA-Mg-G, con difusión de pigmentación violeta que aparecía desde las 72 horas de cultivo hasta aproximadamente los 10 días desde que se inoculó la bacteria en medio sólido. A partir de entonces, la pigmentación se tornaba marrón muy oscuro.

En medio líquido se difundía una pigmentación roja-marrón, y nunca se apreció una clara pigmentación violeta. El servicio de análisis de la colección alemana de bacterias DSMZ detectó la presencia mayoritaria de la variante LL del ácido diaminopimélico. El crecimiento a diferentes temperaturas mostró un crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C, aunque fue capaz de crecer a 5 y 32 °C. No creció a 37°C. El rango de concentración de NaCl tolerable estuvo entre 0-15%, creciendo débilmente al 15%. Oxidasa positiva. Negativo para la reducción del nitrato, producción de indol a partir de triptófano y fermentación de glucosa. Actividad arginina dehidrolasa negativa, ureasa positiva. Positivo para la hidrólisis por β -glucosidasa y negativo para proteasa. Positivo para β -galactosidasa. Asimiló glucosa, arabinosa, manosa, manitol, n-acetil-glucosamina, gluconato potásico, citrato trisódico y ácido málico. No asimiló maltosa, ácido cáprico, ácido fenilacético y ácido adípico. Creció utilizando las siguientes fuentes de carbono simple: Sacarosa, maltosa, manosa, glicerol, D-galactosa, xilosa, fructosa, myo-inositol, glucosa y manitol. Creció débilmente con lactosa. No creció con dextrano. Los ácidos grasos predominantes fueron iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0} e iso-C_{15:0}. En menor cantidad también estaban presentes C_{16:0}, anteiso-C_{17:0}, iso-C_{14:0}, iso-C_{16:1H} y C_{17:0}.

Las características fenotípicas obtenidas a través del uso de medios de cultivo definidos por el “International *Streptomyces* Project” (ISP) se describen en la Tabla 4.12:

Tabla 4.12. Crecimiento y características de cultivos ISP de MZ0467C. Las placas de cultivo en medio sólido se incubaron a 30 °C durante 10 días.

Medio de cultivo	Crecimiento	Color del micelio aéreo	Color del reverso del micelio
ISP2	Bueno	Blanco	Marrón claro
ISP3	Bueno	Gris	Marrón
ISP4	Bueno	Blanco	Marrón
ISP5	Bueno	Marrón	Marrón
ISP6	Bueno	Blanco	Marrón claro
ISP7	Bueno	Blanco	Blanco

La Tabla 4.13 presenta las diferentes características fisiológicas entre MZ0467C y las especies de referencia:

Tabla 4.13. Características fenotípicas que diferencian a la cepa MZ0467C de las especies de *Streptomyces* filogenéticamente más cercanas. Cepa 1: MZ0467C; Cepa 2: *Streptomyces aureus* NBRC 100912T; Cepa 3: *Streptomyces kanamyceticus* NRRL:B:2535T. + positivo; - negativo; (+) positivo débil.

Característica	1	2	3
Crecimiento			
15% NaCl	(+)	+	+
Reducción nitrato	-	-	+
Ureasa	+	-	+
Hidrólisis (proteasa)	-	-	+
Oxidasa	+	-	+
Asimilación API 20 NE			
D-maltosa	+	+	-
Ácido adípico	-	+	-
Ácido fenilacético	-	+	-
Crecimiento en carbono simple (1% p/v)			
Manosa	+	(+)	+
Lactosa	(+)	(+)	+
Xilosa	+	(+)	+
Glucosa	+	(+)	+
Difusión de pigmento en NA-Mg-G	Violeta	Amarillo claro	No
Contenido %GC	70,2	71,5	71,0

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos de caracterización reforzaron la hipótesis de que la cepa MZ0467C se correspondiera con una nueva especie con asignación al género *Streptomyces*. A falta de corroborar este hecho con el análisis comparativo del genoma completo descritos en el capítulo 5, se propuso el nombre de *Streptomyces tigalatensis*.

Cepas MZ0337C2 y MZ0348B

La cepa MZ0337C2 presentó un micelio aéreo blanco y un reverso de color beige en el medio de cultivo NA-Mg-G. No presentó pigmento difusible. El servicio de análisis de la colección alemana de bacterias DSMZ detectó la presencia mayoritaria de la variante LL del ácido diaminopimélico. El crecimiento a diferentes temperaturas mostró un crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C, aunque fue capaz de crecer a 5 y 37 °C. No creció a 40°C. El rango de concentración de NaCl tolerable estuvo entre 0-15%. Oxidasa negativa. Negativo para la reducción del nitrato, producción de indol a partir de triptófano y fermentación de glucosa. Actividades arginina dehidrolasa y

ureasa positivas. Positivo para la hidrólisis por β -glucosidasa y proteasa. Negativo para β -galactosidasa. Asimiló glucosa, manosa, manitol, n-acetil-glucosamina, gluconato potásico, citrato trisódico, ácido fenilacético y ácido málico. No asimiló arabinosa, maltosa, ácido cáprico y ácido adípico. Creció utilizando las siguientes fuentes de carbono simple: Sacarosa, maltosa, manosa, glicerol, xilosa, myo-inositol y manitol. Creció débilmente con lactosa, D-galactosa, fructosa y glucosa. No creció con dextrano. Los ácidos grasos predominantes fueron iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} e iso-C_{14:0}. En menor cantidad también estuvieron presentes iso-C_{15:0} y suma de ácidos grasos 3.

MZ0348B presentó la formación de un reverso del micelio de color verde oscuro, casi negro, y ocasionalmente blanco para el micelio aéreo en el medio de cultivo NA-Mg-G. No presentó pigmento difusible. El servicio de análisis de la colección alemana de bacterias DSMZ detectó la presencia mayoritaria de la variante LL del ácido diaminopimélico. El crecimiento a diferentes temperaturas mostró un crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C, aunque fue capaz de crecer a 5 y 37 °C. No creció a 40°C. El rango de concentración de NaCl tolerable estuvo entre 0-15%, creciendo débilmente al 15% de NaCl. Oxidasa negativa. Negativo para la reducción del nitrato, producción de indol a partir de triptófano y fermentación de glucosa. Actividad arginina dehidrolasa negativa, ureasa positiva. Positivo para la hidrólisis por β -glucosidasa y proteasa. Negativo para β -galactosidasa. Asimiló glucosa, manosa, manitol, n-acetil-glucosamina, gluconato potásico, citrato trisódico, ácido fenilacético y ácido málico. No asimiló arabinosa, maltosa, ácido cáprico y ácido adípico. Creció utilizando las siguientes fuentes de carbono simple: Sacarosa, maltosa, manosa, glicerol, D-galactosa, xilosa, lactosa, D-galactosa, fructosa y glucosa. Creció débilmente con myo-inositol y manitol. No creció con dextrano. Los ácidos grasos predominantes fueron iso-C_{16:0}, iso-C_{14:0}, anteiso-C_{15:0} y C_{16:0}. En menor cantidad también estuvo presente iso-C_{15:0}.

Las características fisiológicas obtenidas a través del uso de medios de cultivo definidos por el “International *Streptomyces* Project” (ISP) se describen en la Tabla 4.14:

Tabla 4.14. Crecimiento y características de cultivos ISP de MZ0337C2 y MZ0348B. Las placas de cultivo en medio sólido se incubaron a 30 °C durante 10 días.

Medio de cultivo	Cepa	Crecimiento	Color del micelio aéreo	Color del sustrato del micelio
ISP2	MZ0337C2	Bueno	Blanco	Blanco
ISP3		Bueno	Blanco	Blanco
ISP4		Bueno	Marrón oscuro	Marrón
ISP5		Bueno	Crema anaranjado	Crema anaranjado
ISP6		Bueno	Beige	Beige
ISP7		Bueno	Marrón	Marrón
ISP2	MZ0348B	Bueno	Verde claro	Verde claro
ISP3		Bueno	Verde claro	Verde claro
ISP4		Bueno	Beige	Blanco
ISP5		Bueno	Crema anaranjado	Crema anaranjado
ISP6		Bueno	Naranja	Naranja
ISP7		Bueno	Marrón	Negro

En la Tabla 4.15 se pueden apreciar las diferencias fisiológicas entre MZ0337C2, MZ0348B y las especies de referencia:

Tabla 4.15. Características fenotípicas que diferencian a las cepas MZ0337C2 y MZ0348B de las especies de *Streptomyces* filogenéticamente más cercanas. Cepa 1: MZ0337C2; Cepa 2: MZ0348B; Cepa 3: *Streptomyces palmae* CMU-AB204T; Cepa 4: *Streptomyces catenulae* NRRL B-2342T; Cepa 5: *Streptomyces ramulosus* NRRL B-2714T. + positivo; - negativo; (+) positivo débil. ND, no disponible.

Característica	1	2	3	4	5
Crecimiento					
6% NaCl	+	+	-	+	+
15% NaCl	+	(+)	-	+	+
Reducción nitrato	-	-	+	+	-
Ureasa	+	+	-	+	+
Arginina dihidrolasa	+	-	-	+	-
Hidrólisis (β -glucosidasa)	+	+	+	-	+
β -galactosidasa (para-nitrofenil- β D-Galactopiranosidasa)	-	-	+	-	+
Oxidasa	-	-	+	-	-
Asimilación API 20 NE					
Arabinosa	-	-	+	-	-
Manosa	+	+	-	+	+
Manitol	+	+	-	+	+
D-maltosa	-	-	-	+	+
Ácido adípico	-	-	+	-	+
Citrato trisódico	+	+	-	-	-
Crecimiento en carbono simple (1% p/v)					
Manosa	+	+	(+)	+	+
Lactosa	(+)	+	(+)	+	+
D-galactosa	(+)	+	(+)	+	+
Fructosa	(+)	+	+	+	+
Xilosa	+	+	-	(+)	+

Característica	1	2	3	4	5
Glucosa	(+)	+	(+)	+	+
Myo-inositol	+	(+)	(+)	(+)	+
Sacarosa	+	+	(+)	+	+
Manitol	+	(+)	-	+	+
Difusión de pigmento en NA-Mg-G	No	No	No	Oscuro	Oscuro
Contenido %GC	72,1	72,1	72,4	73	ND

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos de caracterización reforzaron la hipótesis de que las cepas MZ0337C2 y MZ0348B se correspondieran con dos cepas de una nueva especie con asignación al género *Streptomyces*. A falta de corroborar este hecho con los análisis comparativos de los genomas completos descritos en el capítulo 5, se propuso el nombre de *Streptomyces benahoarensis*, siendo la cepa tipo MZ0337C2.

4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

De forma complementaria, se realizaron el análisis de hongos en las muestras (Tabla 4.16). No se apreció una gran diversidad en los distintos tubos de lava, puesto que en algunos de ellos no se consiguió aislamiento alguno.

La identificación taxonómica se realizó analizando los espaciadores internos transcritos (ITS), a través de la secuenciación de esta región del ADN y su posterior búsqueda de especies cultivables más cercanas usando el algoritmo BLAST de la web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se aislaron un total de 15 cepas fúngicas de las que 11 fueron aisladas de distintas muestras del tubo de lava “Fuente de La Canaria” y las cuatro restantes del tubo “Cueva del Llano de los Caños”. Se identificaron tres filos de hongos donde el grupo *Ascomycota* fue el más abundante con 13 cepas clasificadas. Con una cepa aislada, se identificaron los filos *Mucoromycota* y *Basidiomycota*. A nivel de género, se identificaron *Pochonia*, *Metapochonia*, *Gliomastix*, *Heteroconium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Xylaria*, clasificadas en el filo *Ascomycota*, y *Mortierella* y *Solicoccozyma*, para los filos *Mucoromycota* y *Basidiomycota*, respectivamente.

Pochonia bulbillosa, también denominado *Verticillium bulbillosum* o *Metapochonia bulbillosa* es un hongo entomopatogénico, aunque se ha localizado recurrentemente en suelos y rizosferas de diferentes especies

vegetales, que ha presentado propiedades antimicrobianas (Yang y col., 2015). Nunca ha sido descrita su presencia en cuevas. En cambio, *Metapochonia variabilis* ha sido descrita recientemente como nueva especie y su fuente de aislamiento se ubica en cuevas kársticas de China.

Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son muy comunes en cuevas (Do Campo y col., 2010; Vaughan y col., 2011), siendo el foco de atención al estar relacionados con el biodeterioro de pinturas rupestres, así como por su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos y a su papel en procesos biogeoquímicos de movilización de minerales, tanto carbonatados como silicatados (Bastian y col., 2010; Cai y col., 2013; Blunt y col., 2015; Imhoff, 2016; Rusakov y col., 2016). Estos grupos, junto con *Trichoderma*, parecen estar relacionados en procesos de biomineralización y oxidación, debido a su interacción con los minerales (Ogorek y col., 2016). Además, *Penicillium* es un grupo con un gran potencial biotecnológico ya que es capaz de producir una gran variedad de metabolitos secundarios incluyendo antibióticos (Rancic y col., 2006; Nicoletti y col., 2007; Lucas y col., 2010). El grupo *Talaromyces* es un género teleomorfo de *Penicillium* (Pitt, 1980).

Gliomastix murorum, al igual que *Penicillium* y *Aspergillus*, parece tener una fuerte implicación en procesos de degradación del patrimonio cultural, ya que esta cepa fue originalmente aislada en los murales de Takamatsuzuka y Kitora Tumuli, en Japón (Kiyuna y col., 2011).

Heteroconium sp. ha sido descrita como una especie endofítica de raíces de numerosas especies vegetales en diferentes localizaciones geográficas y nunca ha sido descrita en estudios microbiológicos en ambientes subterráneos con anterioridad.

El género *Xylaria* ha sido comúnmente asociado a eventos de degradación de la celulosa en procesos de descomposición de determinadas especies vegetales debido a la actividad de la enzima catalasa. Se ha encontrado en cuevas de Puerto Rico asociado a la entrada de materia orgánica por parte de murciélagos junto a otras especies de hongos guanofílicos (Nieves-Rivera y col., 2009).

Cladosporium, al igual que *Aspergillus*, es un género muy estudiado por inducir determinadas patologías en humanos por parte de algunas especies clasificadas en este grupo. Muy recurrente en cuevas, ha presentado una

elevada abundancia en estudios de aerobiología de diversas cuevas kársticas de España (Dominguez-Monino, Tesis, 2015. También ha sido descrito en depósitos de moonmilk, lo que podría implicar a *Cladosporium*, entre otros, en los procesos de formación de estos espeleotemas (Miller y col., 2018).

Mortierella humilis, identificado en el “Fuente de La Canaria”, fue originalmente aislado en la cueva kárstica “Castañas de Ibor”, la cual presenta altos niveles de radón. Es un género guanofílico que ha sido encontrado en las comunidades fúngicas presentes en cuevas donde se han dado procesos de biodeterioro del arte rupestre (Mitova y col., 2017).

Existen pocas referencias del género *Solicoccozyma*. Se ha definido como un grupo que congrega especímenes halotolerantes, así como algunos relevantes en la descomposición de la materia vegetal. No se ha descrito presencia alguna de ningún miembro de este género en cavidades, tubos de lava u otros medios subterráneos relacionados.

Tabla 4.16. Identificación de los hongos aislados. Los números de acceso de las cepas aisladas no han sido liberados por la base de datos NCBI.

Tubo de lava	Cepa	Identificación (Nº Acceso)	Similitud (%)
Fuente de La Canaria	MZ032FG	<i>Pochonia bulbillosa</i> (LC010959)	99
	MZ034FG	<i>Mortierella humilis</i> (FR799448)	89
	MZ037FG	<i>Aspergillus aculeatus</i> (MH137917)	100
	MZ038FG	¹ <i>Penicillium</i> sp.	99
	MZ039FG	<i>Cladosporium subuliforme</i> (MG751277)	99
	MZ0310FG	<i>Penicillium glabrum</i> (MG020350)	99
	MZ0328FG	<i>Xylaria</i> sp. (KP689114)	98
	MZ0315FG	<i>Metapochonia variabilis</i> (U746684)	99
	MZ0325FG	<i>Gliomastix murorum</i> (AB540543)	100
	MZ0322FG	<i>Trichoderma inhamatum</i> (JX241670)	100
	MZ0323FG	² <i>Trichoderma</i> sp.	100
Cueva del Llano de los Caños	MZ0417FG	<i>Solicoccozyma phenolicus</i> (NR_073222)	99
	MZ0418FG	<i>Aspergillus versicolor</i> (KY828903)	100
	MZ0430FG	<i>Heteroconium</i> sp. (KT270001)	97
	MZ0427FG	<i>Talaromyces</i> sp. (KT264489)	99

¹ Cepa que comparte similitud con *Penicillium miczynskii* (MH865287) y *Penicillium pancosmum* (MF803943).

² Cepa que comparte similitud con *Trichoderma lixii* (EF392747), también denominada *Hypocrea lixii*, y *Trichoderma inhamatum* (JX241670).

CAPÍTULO 5

GENÓMICA FILOGENÉTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE NUEVAS ESPECIES: JSPECIES

5.1 SECUENCIACIÓN DE LOS GENOMAS COMPLETOS DE LAS 3 CEPAS SUSCEPTIBLES DE SER NUEVAS ESPECIES

El análisis de calidad, filtrado de las lecturas y ensamblado del genoma de las cepas MZ0467C, y MZ0337C2 y MZ0348B fue realizado por la propia empresa encargada de la secuenciación del ADN genómico de cada bacteria. Este ensamblado de secuencias realmente se considera un borrador del mapa físico del contenido genético de la bacteria secuenciada, ya que la secuenciación del genoma de cada bacteria susceptible de describirse como nueva especie constituye una mera hipótesis de la verdadera secuencia del genoma subyacente (Ekblom y Wolf, 2014). Este borrador no es la única y verdadera secuencia del genoma de cada bacteria debido a diversos factores, como por ejemplo las variaciones a pequeña y gran escala, como son las delecciones/inserciones de escasos pares de bases o transposiciones que favorecen el reordenamiento del genoma de la bacteria (Roth y col., 1996; Casjens, 1998).

El ensamblado de las lecturas siguió una metodología denominada *de novo*, que se basa en la construcción de secuencias por solapamiento de las lecturas generadas por el ensamblador. En este caso se parte de lecturas cortas producidas por el secuenciador de Illumina que mediante el algoritmo De Bruijn se solapan dando lugar a secuencias más extensas o *contigs* que no pueden ser unidos debido al tipo de secuenciación empleado. La secuenciación de lecturas cortas con Illumina es el método más económico y preciso del mercado actual de NGS, situándolo como el más ampliamente utilizado a nivel mundial (Goodwin y col., 2016). Sin embargo, esta tecnología es incapaz de resolver aquellas secuencias repetitivas que están presentes de forma abundante en la mayor parte de los genomas en mayor o menor medida, dando lugar a ensamblados muy fragmentados donde las posiciones de los *contigs* y las secuencias de unión entre ellos no pueden ser determinadas (Cao y col., 2017). Por lo tanto, si bien el genoma borrador provee una información funcional suficiente de la genética bacteriana, sería necesario realizar secuenciaciones alternativas para obtener un mapa genético ordenado y completo del material genético del organismo.

Tanto la tecnología de secuenciación, como el método de ensamblado contienen sesgos que podrían introducir información errónea en el análisis

de las secuencias (Abnizova y col., 2017). Por lo tanto, el genoma borrador fue filtrado para eliminar secuencias ensambladas con una longitud inferior a 500 pares de bases y cobertura media de lecturas por *contig* superior a 2, para así poder compararlos con aquellos genomas de las bacterias filogenéticamente más próximas a las estudiadas. De esta forma, este filtrado permitiría eliminar secuencias sin significado biológico. El número de *contigs* generados tras el ensamblado, el número de *contigs* filtrados por tamaño y cobertura media, el tamaño total de cada borrador de genoma, en pares de bases (pb), y el contenido GC, se indican en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Resumen de los genomas ensamblados de las cepas bacterianas susceptibles de ser nuevas especies.

Cepas	Contigs ensamblados	Contigs filtrados	Genoma (pb)	Contenido GC
MZ0467C	694	631	9,136,557	70,2%
MZ0337C2	1332	814	7,001,772	72,1%
MZ0348B	1546	1118	6,917,153	72,1%

La comparación de genomas secuenciados mediante tecnologías de NGS constituye una parte fundamental para la determinación de nueva especie. La sustitución de la hibridación ADN-ADN (DDH) por la comparación por pares de los genomas o *pairwise*, desde la aparición de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, ha sido propuesta por numerosos autores (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Goris y col., 2007; Richter y Roselló-Mora, 2009; Lee y col., 2016; Yoon y col., 2017). JSpecies se ha erigido como una de las herramientas para estudios vía simulación computacional o *in silico* que sustituyen la DDH para simplificar la identificación de nuevas especies (Richter y col., 2016). Sin embargo, la comparación de genomas no es más que otro factor a tener en cuenta, pero no definitivo, para la identificación y descripción de una nueva especie bacteriana.

Los índices ANIb (Camacho y col., 2009) y ANIm (Kurtz y col., 2004) fijan en el 95% de similitud los genomas a comparar, que es el valor que se propone como umbral por debajo del cual los genomas son lo suficientemente diferentes como para considerarse especies distintas. TETRA (Teeling y col., 2004a) utiliza frecuencias de tetrámeros estandarizados ofreciendo valores bajo la denominación de “z-score”. De esta forma, los valores por encima de 0,999 indican que los genomas se corresponden con

dos cepas de la misma especie, dentro el rango entre 0,989 y 0,999 se sugiere hacer uso de los valores ANIb y ANIm para determinar si los genomas comparados se corresponden con cepas de la misma o diferente especie, y por último los valores que se encuentren por debajo de 0,989 indicarían que las diferencias encontradas entre los genomas son suficientes para la diferenciación de las cepas analizadas. El análisis TCS (Teeling y col., 2004b) utiliza la misma metodología del apartado TETRA para buscar qué genoma o genomas existentes en la base de datos interna son más próximos al analizado.

En la Tabla 5.2 y 5.3 se indican los valores para los índices ANIb, ANIm, TETRA y TCS para las cepas MZ0467C con *Streptomyces aureus* (NZ_JNZD01000001) y *Streptomyces kanamyceticus* (número de acceso: NZ_LIQU01000001), y las cepas MZ0337C2 y MZ0348B con *Streptomyces palmae* (número de acceso: SRID00000000) y *Streptomyces catenulae* (GCA_000718015), respectivamente.

5.1.1 COMPARACIÓN DE MZ0467C CON LAS ESPECIES DE *STREPTOMYCES* MÁS CERCANAS

Los valores obtenidos en la tabla de comparación de la cepa aislada MZ0467C y las bacterias del género *Streptomyces* más próximas apuntan al reconocimiento de esta cepa como nueva especie. Los valores TETRA sitúan a la cepa aislada y a *S. kanamyceticus* como especies muy próximas, puesto que sitúan a la cepa de estudio en el límite entre definirse como nueva especie o como una cepa de la misma especie. No obstante, los valores de ANIb y ANIm descartan este último caso.

Igualmente, la comparación de la cepa aislada con los genomas presentes en la base de datos ha presentado al genoma de *S. aurantiacus* JA 4570 (número de acceso: GCA_001418335) como el más próximo tanto a la cepa MZ0467C como a *S. kanamyceticus*, situándose para el primer caso en el rango que las diferencia o iguala a la misma especie.

Tabla 5.2. Comparación de genomas según proximidad obtenida por el análisis del gen ARNr 16S y resto de genes del estudio MLSA para la cepa MZ0467C.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. kanamyceticus</i>	MZ0467C
ANiB			
<i>S. aureus</i>	*	78,46	78,75
<i>S. kanamyceticus</i>	77,78	*	82,00
MZ0467C	78,64	82,81	*
ANIm			
<i>S. aureus</i>	*	85,59	85,43
<i>S. kanamyceticus</i>	85,58	*	87,13
MZ0467C	85,45	87,13	*
TETRA			
<i>S. aureus</i>	*	0,96149	0,96861
<i>S. kanamyceticus</i>	0,96149	*	0,9899
MZ0467C	0,96861	0,9899	*
TCS			
<i>S. griseochromogenes</i> ATCC 14511	0,99358	*	*
<i>S. aurantiacus</i> JA 4570	*	0,9879	*
<i>S. aurantiacus</i> JA 4570	*	*	0,98972

En azul se indican los valores TETRA y TCS que sugieren acudir a los resultados de ANiB y ANIm para determinar si la cepa se corresponde con una nueva especie. El resto de valores son coloración específica indican que los genomas comparados se corresponden con especies distintas.

5.1.2 COMPARACIÓN DE MZ0337C2 Y MZ0348B CON LAS ESPECIES DE *STREPTOMYCES* MÁS CERCANAS

En el caso de las cepas MZ0337C2 y MZ0348B, el análisis comparativo de genomas generó valores para los índices ANiB, ANIm y TETRA que indican que ambas cepas se identifican como la misma especie. Del mismo modo, la comparación de ambas con *S. palmae* resultó obtener valores inferiores a los obtenidos en la comparación con *S. catenuale*. Si bien para esta última especie el valor del índice TETRA podría poner en duda la asignación de nueva especie a las cepas de estudio, los valores de ANiB y ANIm indican que MZ0337C2 y MZ0348B son dos cepas de una misma especie nunca antes identificada.

La comparación con genomas registrados en la base de datos establece índices de similitud por debajo del umbral que indicaría a ambos genomas como cepas de la misma especie, para las dos cepas de estudio. En el caso de MZ0337C2 el genoma más cercano se correspondía con la cepa denominada como *Streptomyces* sp. SM8 (número de acceso: GCA_000299175.2), mientras

que para MZ0348B, el genoma más similar se correspondía con el registrado para la cepa *S. natalensis* ATCC 27448 (número de acceso: GCA_000935125).

Tabla 5.3. Comparación de genomas según proximidad obtenida por el análisis del gen ARNr 16S y resto de genes del estudio MLSA para las cepas MZ0337C2 y MZ0348B.

	<i>S. palmae</i>	<i>S. catenulae</i>	MZ0337C2	MZ0348B
ANiB				
<i>S. palmae</i>	*	76,95	76,98	77,01
<i>S. catenulae</i>	77,97	*	91,32	91,35
MZ0337C2	77,98	91,20	*	99,96
MZ0348B	77,93	91,14	99,98	*
ANIm				
<i>S. palmae</i>	*	85,52	85,54	85,56
<i>S. catenulae</i>	85,52	*	92,57	92,65
MZ0337C2	85,54	92,56	*	99,99
MZ0348B	85,55	92,65	99,99	*
TETRA				
<i>S. palmae</i>	*	0,93579	0,95066	0,95231
<i>S. catenulae</i>	0,93579	*	0,99246	0,99379
MZ0337C2	0,95066	0,99246	*	0,99949
MZ0348B	0,95231	0,99379	0,99949	*
TCS				
<i>S. albus subs. albus</i> NRRL B-2513	0,99575	*	*	*
<i>Streptomyces</i> sp. KE1	*	0,97339	*	*
<i>Streptomyces</i> sp. SM8	*	*	0,9773	*
<i>S. natalensis</i> ATCC 27448	*	*	*	0,97889

Los valores rojos indican que ambos genomas se identifican como la misma especie. En azul se indican los valores TETRA y TCS que sugieren acudir a los resultados de ANiB y ANIm para determinar si la cepa se corresponde con una nueva especie. El resto de valores son coloración específica indican que los genomas comparados se corresponden con especies distintas.

CAPÍTULO 6

GENÓMICA FUNCIONAL DE LAS NUEVAS
ESPECIES DE *STREPTOMYCES*. RESISTOMA
Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS ACTIVOS

6.1 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MZ0467C

El procesado del genoma de MZ0467C para la predicción de genes con la herramienta prodigal generó dos archivos en formato *fasta* con las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Este último archivo fue el utilizado en Sma3s para el estudio de anotaciones. De las 8704 secuencias predichas totales se identificaron anotaciones en 1812 de ellas, las cuales se han podido clasificar según su influencia en rutas metabólicas, procesos biológicos y componentes celulares. De estas proteínas anotadas, 719 intervienen en rutas metabólicas de la cepa de estudio (Fig. 6.1).

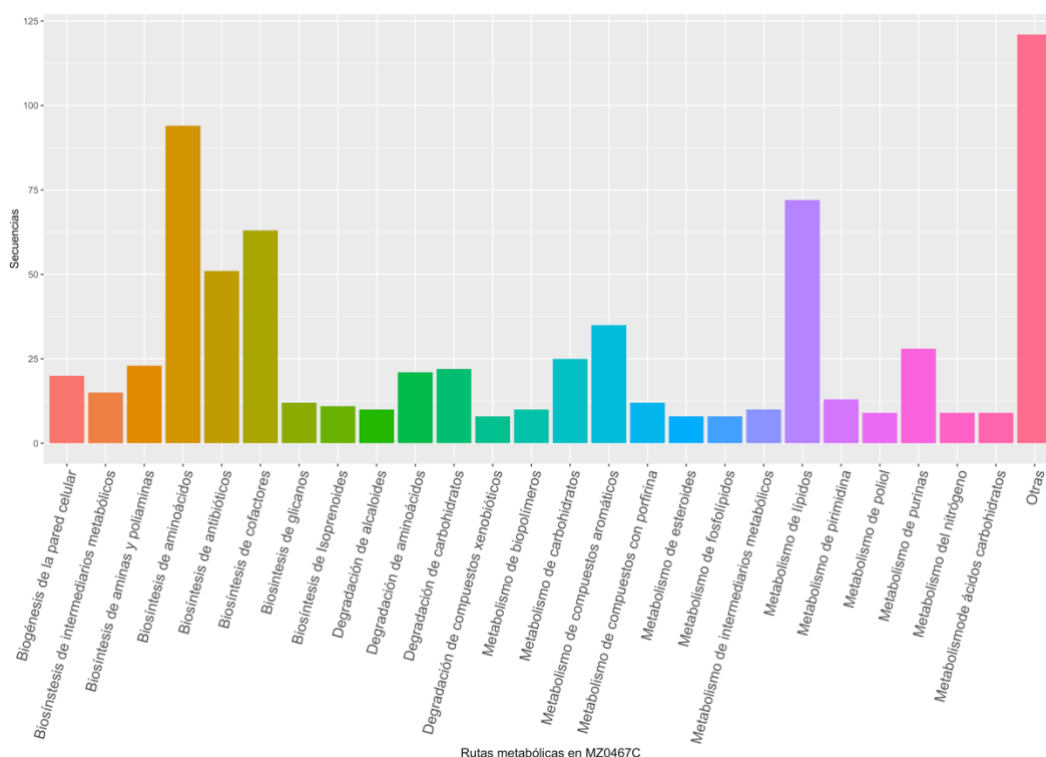


Figura 6.1. Diagrama de barras representando las rutas metabólicas presentes en la cepa MZ0467C. Se muestran aquellas rutas con un peso específico de las secuencias predichas igual o superior al 1% del total. El grupo “Otras” acumula aquellas rutas que poseen un peso específico inferior al 1%.

Los cinco grupos de rutas metabólicas con mayor número de secuencias de proteínas involucradas fueron aquellos relacionados con la

biosíntesis de aminoácidos, metabolismo de lípidos, biosíntesis de cofactores, biosíntesis de antibióticos y metabolismo de compuestos aromáticos, con 94, 72, 63, 51 y 35 secuencias identificadas, respectivamente. En la referencia identificada como “Otras” se incluyen rutas o grupos de rutas con una presencia inferior al 1% total de secuencias predichas de la cepa. La biosíntesis de pigmentos, antifúngicos, esteroides o carotenoides, así como rutas implicadas en el metabolismo del azufre, terpenos o flavonoides, son algunos de estos ejemplos.

De las 1812 secuencias, 1805 están identificadas en la base de datos como proteínas implicadas en procesos biológicos (Fig. 6.2).

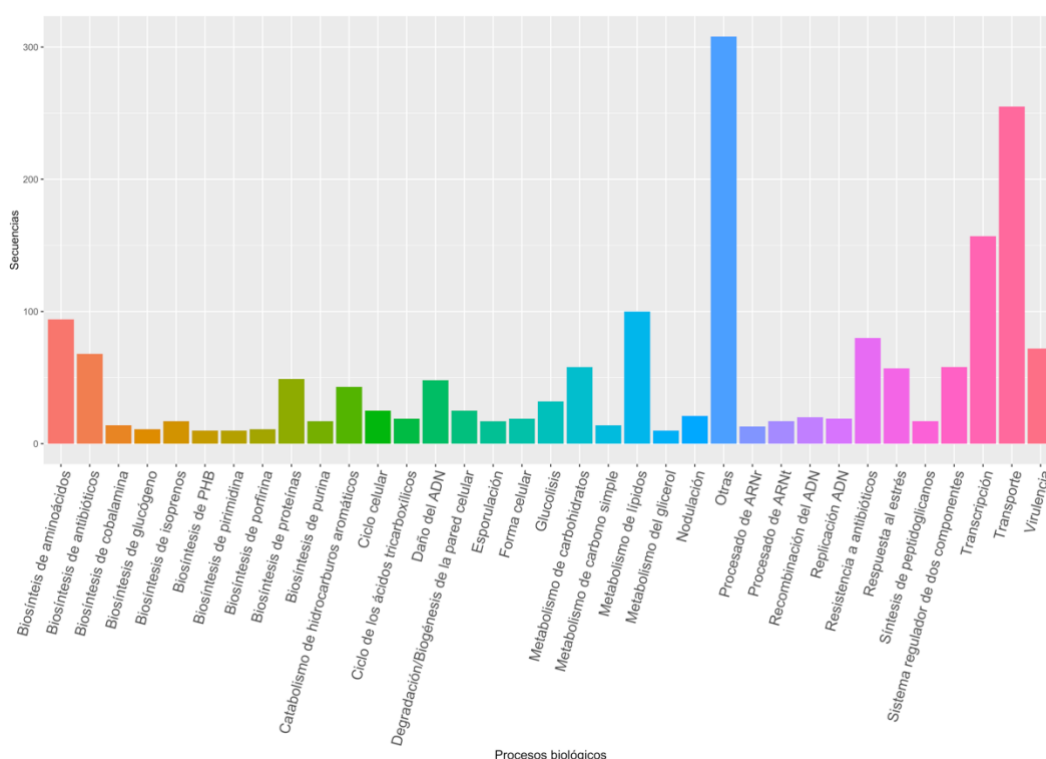


Figura 6.2. Diagrama de barras representando los procesos biológicos en MZ0467C. Se indican los procesos biológicos con un mínimo de 10 secuencias proteicas predichas para la cepa de estudio. El grupo “Otras” incluye a aquellos procesos que poseen 9 o menos secuencias proteicas.

Los procesos biológicos más destacados, de acuerdo al número de proteínas que intervienen en ellos son el transporte de moléculas intra o extracelularmente, mecanismo de transcripción, metabolismo de lípidos, biosíntesis de aminoácidos, resistoma o resistencia a antibióticos, mecanismos de virulencia, biosíntesis de antibióticos, metabolismo de carbohidratos, sistema de dos componentes y respuesta a estrés, presentando 255, 157, 100, 94, 80, 72, 68, 58, 58 y 57 proteínas, respectivamente. Dentro del grupo “Otras” se incluyen procesos biológicos como la asimilación del nitrato o la fijación del oxígeno, la biosíntesis de melanina, riboflavina o ubiquinona, entre otros.

Por último, hasta 787 proteínas se localizaron formando parte de componentes específicos celulares o extracelulares (Fig. 6.3).

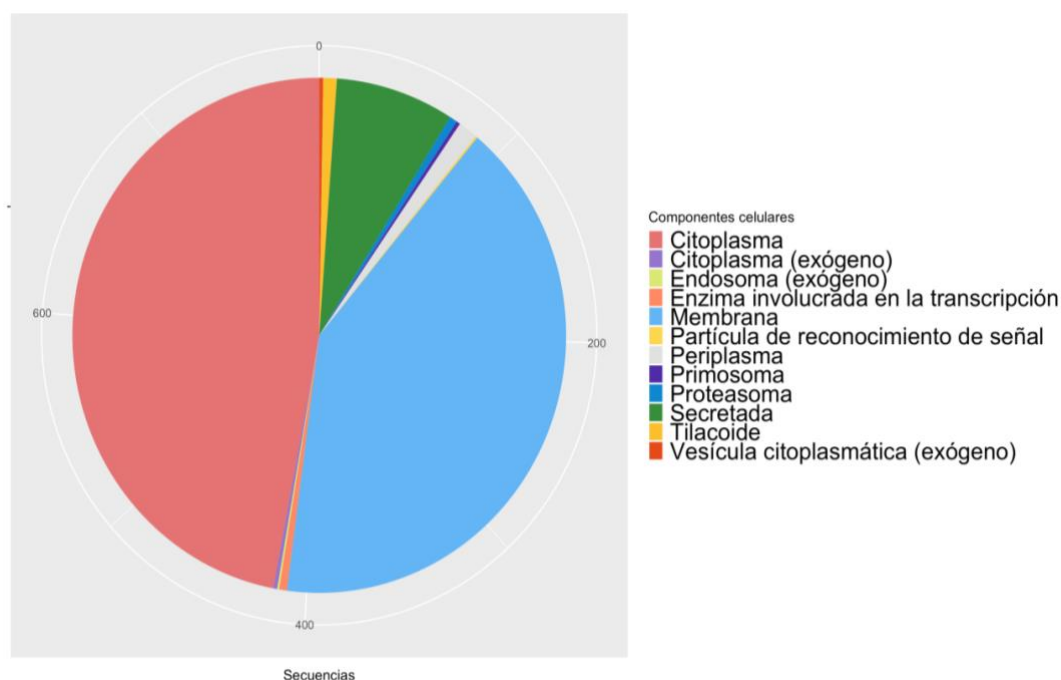


Figura 6.3. Gráfico circular representando los componentes celulares donde las 787 secuencias proteicas predichas en MZ0467C han sido identificadas y agrupadas. Las referencias marcadas como “exógeno” se refieren a proteínas que, si bien funcionan en dichos componentes celulares de la bacteria, su origen proviene de la inclusión de material genético viral.

6.1.1 RESISTOMA DE MZ0467C

La resistencia a antibióticos por parte de microorganismos patógenos de humanos se ha convertido en una emergencia global. Por lo tanto, es necesario el descubrimiento de nuevos reservorios de compuestos activos que también sirvan para ayudar en la comprensión de la evolución y origen de aquellos mecanismos que dotan a los microbios de dicha resistencia. Estudios durante la última década han revelado que la resistencia a antibióticos es común tanto en los microorganismos contemporáneos como en la antigüedad (Perry y col., 2014). Análisis de muestras de permafrost de entre 5000 y 30000 años pusieron de manifiesto mecanismos y elementos de resistencia a penicilina, tetraciclina y antibióticos glucopéptidos y aminoglucósidos (D'Costa y col., 2011; Perron y col., 2015), resultados que concuerdan con los obtenidos en estudios del *resistoma* de los microorganismos actuales, es decir, del conjunto de genes que proveen a la célula de la resistencia contra los compuestos antimicrobianos (Walsh y Duffy, 2013; Wichmann y col., 2014; Forsberg y col., 2014). La resistencia a antibióticos es, por tanto, previa a la producción, distribución y consumo de estos fármacos de la actualidad, es ampliamente diversa y globalmente distribuida (Pawlowski y col., 2016).

Las cuevas de diferentes características no están exentas de disponer de su propio *resistoma*. Bhullar y colaboradores (2012) publicaron un estudio donde analizaban los mecanismos de resistencia a antibióticos de microorganismos que colonizaban la cueva de Lechuguilla (EE.UU.), con zonas aisladas de la superficie por más de 4 millones de años, sin que existiera la influencia de animales o metazoos en el ambiente. Estos genes conservados abren la puerta a profundizar en los estudios de microorganismos en ambientes subterráneos para tratar de ampliar el conocimiento de los mecanismos de resistencia.

El estudio del *resistoma* basado en el análisis de las secuencias proteicas predichas por el software prodigal y la caracterización de estas presentó una serie de enzimas clasificadas por familias que están involucradas en mecanismos de defensa ante compuestos antibacterianos (Tabla 6.1). Se hizo uso de la base de datos revisada SWISSProt de Uniprot filtrada con todas las referencias relativas a antibióticos, ejecutando BLAST para alinear las secuencias y presentar homología con un mínimo de similitud del 40% entre ellas y un valor E o valor de expectativa inferior a

0,001. El valor E es un parámetro de significación estadística que evalúa el número de alineamientos que se pueden obtener de forma azarosa en una base de datos, de manera que cuanto menor sea el valor E, más significativo y confiable es el alineamiento. Estos parámetros definidos ofrecen una estimación en la funcionalidad de la secuencia proteica semejante a la desarrollada con la secuencia alineada (Pearson, 2013), de manera que se dan indicios para la existencia de mecanismos de resistencia a antimicrobianos en la cepa de estudio.

Así, el análisis ha presentado homología con secuencias previamente estudiadas, principalmente en enterobacterias, implicadas en mecanismos de resistencia a polimixina (Noland y col., 2002; Breazeale y col., 2003). La enzima *aminotransferasa* identificada sintetiza una variante de arabinosa que se sitúa en la membrana externa de la célula y evita el paso del antibiótico.

La interacción entre la *ADN girasa*, una proteína tetramérica compuesta por dos subunidades, A y B (Drlica y Zhao, 1997), y las quinolonas parece implicar a regiones conservadas llamadas regiones determinantes de resistencia a la quinolona (QRDR) en ambas subunidades (Yoshida y col., 1990; Yoshida y col., 1991). La presencia de los genes que expresan a ambas subunidades en la cepa de estudio podría evidenciar la capacidad para resistir a distintas fluoroquinolonas, como la novobiocina, un antibiótico propio del género *Streptomyces* (Thiara y Cundliffe, 1993).

La *macrólido glucosiltransferasa* es una enzima de las familias de las glucosiltransferasas que inactiva la actividad de los compuestos macrólidos vía 2'-O-glucosilación usando UDP-glucosa (Cundliffe, 1992a y 1992b). Los macrólidos son moléculas de elevado interés clínico debido a su actividad antibiótica. El primer macrólido, la picromicina, se aisló de una cepa de *Streptomyces* en los años 50 del siglo XX, aunque fue la eritromicina la molécula más conocida y a partir de la cual se han gestado gran parte de los macrólidos de segunda generación (Dinos, 2017). Se ha identificado por homología la posible presencia de la enzima *oleandomicina glucosiltransferasa*, que inactiva la capacidad del antibiótico oleandomicina (Hernandez y col., 1993).

En la cepa de estudio fueron identificados diferentes genes que expresan a enzimas asociadas a mecanismos de resistencia contra antibióticos β -lactámicos. Las *β -lactamasas* son enzimas que catalizan la

hidrólisis de un enlace amida en el anillo β -lactámico de los antibióticos incluidos en las familias de las penicilinas y cefalosporinas (Ambler, 1980; Pastor y col., 1990). Todas las secuencias alineadas identificadas con β -*lactamasas* superaron el 50% de homología, lo que parece una confiable predicción de la presencia de estas enzimas en la cepa de estudio.

La *aspartato 1-descarboxilasa* es una enzima involucrada en la síntesis de la beta-alanina. La sobreexpresión del gen *panD* que expresa a esta proteína, confiere resistencia contra el componente activo de la pirazinamida, un fármaco anti tuberculosis (Shi y col., 2014).

La cepa presenta secuencias de similitud cercana al 85% con genes implicados en la resistencia a la bacitracina a través del complejo enzimático compuesto por las *undecaprenil-difosfatasa*s 1, 2 y 3 (Fichas Q0RKT0, Q2J987 y Q2J4I7 UniProt). La bacitracina actúa en la inhibición de la síntesis de peptidoglicanos.

La cepa de estudio podría presentar mecanismos de resistencia a péptidos catiónicos antimicrobianos (PCAs) que producen otros microorganismos competidores. Este mecanismo se observó en *Mycobacterium tuberculosis*, otorgando esta anotación a la cepa de estudio por homología en una cepa de *Rhodococcus* (Ficha UniProt C0ZL89). La enzima *lisil-ARNt sintetasa* interviene en la producción de lisil-fosfatidil-glicerol (LPG), que es un componente con carga negativa de la membrana plasmática de bacterias, de manera que contribuye en la resistencia a PCAs.

La *nitrohidrolasa 2-nitroimidazol* está implicada en la biodegradación del antibiótico 2-nitroimidazol utilizado para tratar la tuberculosis, enfermedad del Chagas y el cáncer (Qu y Spain, 2011).

Las *aminoglucósido 3-N-acetiltransferasas* son enzimas que confieren resistencia a antibióticos del tipo amino glucósidos como la kanamicina o la paromomicina (Ishikawa y Kunimoto, 1991). En la cepa de estudio se obtuvieron valores de similitud de entre el 60% y el 80%, lo que parece asegurar el desarrollo de esta funcionalidad.

La *glutamina sintetasa* (GSII), expresada por el gen *glnII*, cataliza la biosíntesis ATP-dependiente de glutamina desde glutamato y amoníaco. La sobreexpresión de la *glutamina sintetasa* confiere resistencia contra el antibiótico fosfotricil-alanil-alanina (Behrmann y col., 1990). El

alineamiento presentó un 86,6% de similitud, lo que parece indicar que dicha funcionalidad se lleva a cabo por parte de la cepa de estudio.

La enzima reguladora de resistencia a los nosiheptidos es una proteína putativa que inhibe el efecto de estos antibióticos de la familia de los tiopéptidos (Li y col., 1990). En la cepa de estudio se observó una similitud con esta secuencia de más del 72%.

La *blasticidina-S acetiltransferasa* cataliza la transferencia de un grupo acetilo desde el donador de la coenzima A hasta una amina primaria del aceptor, una reacción implicada en la resistencia a determinados antibióticos (Dyda y col., 2000). En este caso otorga resistencia al antibiótico blasticidina S (Zhang y col., 2000).

La evidencia de la resistencia al cloranfenicol se ha obtenido por homología con la secuencia del gen *cmlR* registrada en la base de datos de Uniprot con ficha P31141, descrita en la cepa *Streptomyces lividans* 1326 (Dittrich y col., 1991). Frente a esta secuencia, se ha obtenido un 60% de similitud en la bacteria de estudio.

La *estreptogramina A acetiltransferasa* es una enzima que confiere la resistencia a los compuestos A del grupo de las estreptograminas (también llamadas virginiamicina) vía acetilación enzimática. Su baja solubilidad en agua ha reducido su uso en humanos, sin embargo, es utilizado como aditivo en la alimentación de animales (Pechère, 1996).

La *aculeacina-A acilasa* cataliza la hidrólisis de la fracción palmitoil del antibiótico antifúngico aculeacina-A, dando una fracción hexapéptido y una cadena larga de ácidos grasos (Junji y col., 1992).

Gracias a la evidencia de la presencia de los genes *drmA* y *drmb*, que forman el complejo *DrrAB*, la cepa de estudio podría ser resistente a los antibióticos daunorrubicina y doxorrubicina (gullio, 1991). El alineamiento con las secuencias que componen el complejo ha sido elevado, entre el 66% y el 70%, de manera que se podría asegurar la presencia de este mecanismo en la bacteria de estudio.

La *alanina racemasa* cataliza la interconversión de L-alanina y D-alanina. La sobreexpresión en el promotor confiere resistencia al antibiótico D-cicloserina (Cáceres y col., 1997).

La toxina *RelK* es un componente tóxico del sistema toxina-antitoxina de tipo II que cuando se ve sobreexpresada confiere tolerancia al antibiótico rifampicina (Singh y col., 2010). También se ha observado la presencia del gen que expresa a la proteína *RbpA*, cuya presencia en *Streptomyces coelicolor* confiere resistencia a este mismo antibiótico (Newell y col., 2006).

La enzima *ligasa isoleucina--tRNA* confiere resistencia al antibiótico mupirocina, que funciona inhibiendo la síntesis de isoleucina (Sassanfar y col., 1996).

El factor Trigger está involucrado en la exportación de proteínas, así como en la resistencia del antibiótico estreptomycin (Sharma y col., 2010).

Tabla 6.1. Estudio del *resistoma* de MZ0467C conforme a secuencias incluidas en la base de datos SWISSProt de UniProt.

Enzimas	Resistencia
<i>UDP-4-amino-4-deoxi-L-arabinosa aminotransferasa</i>	Polimixina
ADN girasas	Novobiocina y otras fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)
Glucosiltransferasas (Macrólidos)	Macrólidos
Beta-lactamasas	Beta-lactámicos
<i>Aspartato 1-descarboxilasa</i>	Pirazinamida
<i>Undecaprenil-difosfato fosfatasa</i>	Bacitracina
<i>Lisil-ARNt sintetasa</i>	Péptidos catiónicos antimicrobianos (PCAs)
<i>Nitrohidrolasa 2-nitroimidazol</i>	Nitroimidazoles
Aminoglucósido 3-N-acetiltransferasas	Aminoglucósidos
<i>Glutamina sintetasa</i> (GSII)	Bialafos
Proteína reguladora de resistencia a nosiheptidos	Nosiheptidos (NH)
<i>Blasticidina-S acetiltransferasa</i>	Blasticidina S
Proteína de resistencia al Cloranfenicol	Cloranfenicol
<i>Virginiamicina A acetiltransferasa</i>	Virginiamicina (compuestos clase A)
<i>Aculeacina-A acilasa</i>	Aculeacin-A (antibacteriano y antifúngico)
Resistencia daunorubicina/doxorubicina (Complejo <i>DrrAB</i>)	Daunorrubicina y Doxorubicina
<i>Alanina racemasa</i>	Cicloserina
Toxina <i>RelK</i>	Rifampicina
Proteína <i>RbpA</i>	
<i>Ligasa isoleucina--tRNA</i>	Mupirocina
Factor Trigger	Estreptomycin

6.1.2 PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN MZ0467C

6.1.2.1 PREDICCIÓN DE PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS A TRAVÉS DE UNIPROT

Siguiendo la misma metodología utilizada para el estudio del resistoma de la cepa MZ0467C, en la Tabla 6.2 se propone la capacidad en la bacteria de producir enzimas o complejos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de compuestos antimicrobianos, deducidos por homología a partir de un 40% de similitud entre secuencias comparadas.

Tanto la *valina deshidrogenasa* como *O-metiltransferasa MdmC* y la *eritronolida sintasa* participan en la biosíntesis de antibióticos del tipo macrólidos. La *valina deshidrogenasa* está involucrada en la desaminación oxidativa de aminoácidos de cadena ramificada. El catabolismo de valina es la mayor fuente de precursores de ácidos grasos para la síntesis de macrólidos y una fuente vital de precursores de antibióticos (Tang y col., 1994). En el caso de la *O-metiltransferasa MdmC* se ha descrito su participación en la síntesis de los compuestos midecamicina y espiramicina (Hara y Hutchinson, 1992). Ambas se corresponden con anotaciones descritas originalmente en dos especies de *Streptomyces* (Fichas UniProt P40176 y Q00719). La *eritronolida sintasa* es un complejo enzimático implicado en la síntesis de la eritromicina a través del precursor aglicona, 6-deoxeritronolida B (Khosla y col., 2007).

La *proclavaminato amidinohidrolasa* es una de las enzimas involucradas en la ruta metabólica que sintetiza el ácido clavulónico (Elkins y col., 2002). Esta proteína forma parte de la subruta metabólica que sintetiza clavulanato desde D- gliceraldehído 3-fosfato y L-arginina descrita en *Streptomyces clavuligerus* (Ficha UniProt P0DJQ3).

La *L-glutamina:scylo-inososa aminotransferasa* es una enzima que participa en la biosíntesis de la estreptomicina (Ahlert y col., 1997). Forma parte de un clúster de genes descritos en *Streptomyces griseus* (Ficha UniProt P77952), el cual define el subgrupo filogenético al que la cepa de estudio puede estar asociada de acuerdo al análisis filogenético del gen ARNr 16S (Capítulo 4).

Las subunidades de la *mutasa metilmalonil-CoA* catalizan la conversión de succinil-CoA a metilmalonil-CoA, el cual representa una importante fuente para la producción de antibióticos policetónicos (Birch y col., 1993). Los policetónicos son compuestos naturales que se han convertido en recursos indispensables para el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos como antibióticos, antifúngicos y antitumorales (Newman, 2012).

La *tiorredoxina reductasa* es la única enzima capaz de reducir la tiorredoxina. Forma parte del sistema tiorredoxina-tiorredoxina involucrado en la biosíntesis de penicilinas y cefalosporinas (Aharonowitz y col., 1993).

La *validoxilamina A glucosiltransferasa* es responsable de la biosíntesis del antifúngico validamicina A mediante el acoplamiento final de la glucosa desde la UDP-alfa-D-glucosa a la validoxilamina A para producir el antifúngico (Bai y col., 2006).

La *fenoxazinona sintasa* es una cobre-oxidasa que constituye la fase final en la biosíntesis de la actinomicina. Cataliza el acoplamiento oxidativo de 2-aminofenol para dar lugar al cromóforo 2-aminofenoxazinona (Barry y col., 1989).

Otras secuencias analizadas presentaban homología con el clúster de tres proteínas (B1, B2 y B3) involucradas en la síntesis de la neocarzinostatina, un antibiótico policétido de tipo I (Liu y col., 2005).

La *tirosina amoniaco liasa* interviene en la biosíntesis del antibiótico/antitumor C-1027, descrito en *Streptomyces globisporus*. Cataliza la desaminación MIO-dependiente de L-tirosina generando el correspondiente ácido insaturado α,β . Las enzimas que contienen el grupo MIO, del inglés “methylideneimidazole-5-one”, son las responsables de la biosíntesis de este compuesto (Cooke y Bruner, 2010).

La *sulfato adenililtransferasa* es una enzima descrita en *Streptomyces lavendulae* que está asociada a la síntesis del antitumoral mitomicina C (Mao y col., 1999).

Tabla 6.2. Estudio de síntesis de antimicrobianos en MZ0467C conforme a secuencias incluidas en la base de datos SWISSProt de UniProt.

Enzimas	Antimicrobianos
<i>Valina deshidrogenasa</i>	
<i>O-metiltransferasa MdmC</i>	Macrólidos
<i>Eritronolida sintasa</i>	
<i>Proclavaminato amidinohidrolasa</i>	Ácido clavulónico
<i>L-glutamina:scylo-inososa aminotransferasa</i>	Estreptomicina
<i>Mutasa methilmalonil-CoA</i>	Biosíntesis de antibióticos policetónicos
<i>Tiorredoxina reductasa</i>	Penicilinas y cefalosporinas
<i>Validoxilamina A glucosiltransferasa</i>	Validamicina A
<i>Fenoxazinona sintasa</i>	Actinomicina
Proteínas de síntesis de Neocarzinostatina B1, B2 y B3	Neocarzinostatina
<i>Tirosina amoniaco liasa</i>	C-1027
<i>Sulfato adenililtransferasa</i>	Mitomicina C

6.1.2.2 PREDICCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE ANTI-SMASH

La herramienta antiSMASH realiza un análisis de la biosíntesis de metabolitos secundarios basado en la identificación de clústeres de genes por similitud (Tabla 6.3), reproduciendo un estudio de anotaciones para predecir y categorizar las funciones de los genes. La herramienta hace una predicción de genes utilizando los *contigs* del genoma y los compara con los clústeres presentes en la base de datos. Un total de 31 clústeres de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios fueron identificados en los diferentes *contigs* del genoma de MZ0467C.

AntiSMASH ofreció unos resultados de acuerdo a la homología encontrada con las secuencias de los *contigs* del ensamblado borrador obtenido de la secuenciación del genoma completo.

Tabla 6.3. Clústeres de genes que codifican para metabolitos secundarios en MZ0467C.

Tipo	Desde (pb)	Hasta (pb)	Clúster más próximo	Similitud (%)
Otros (Contig 2)	43423	84115	-	-
Bacteriocina (Contig 3)	7126	17353	-	-
Indol (Contig 7)	25551	46714	7-prenylisatina	40
NRPS-PKS (Contig 9)	11278	63757	Fosfazinomycina	21
Terpenos (Contig 10)	39159	65819	Hopeno	92
NRPS (Contig 12)	1	44260	Griseoviridina / viridogriseina	5
Sideróforo (Contig 13)	9204	24069	Vibrioferina	18
NRPS (Contig 14)	1	46750	Laspartomicina	6

Tipo	Desde (pb)	Hasta (pb)	Clúster más próximo	Similitud (%)
Terpeno (Contig 15)	1	16492	2-Metilisoborneol	100
T1pks- Butirolactona - T2pks (Contig 16)	16	62665	Akaeolide	36
T3pks (Contig 19)	22182	58547	BE-14106	17
T3pks (Contig 22)	3418	44479	Flaviolina	75
Terpeno (Contig 27)	8074	30323	Geosmina	100
Otros-T3pks-Furano (Contig 30)	14104	49813	Meroclorina	31
Terpeno (Contig 31)	23956	44852	-	-
NRPS (Contig 32)	1	49414	Skyllamycina	10
T2pks (Contig 57)	1	34686	Resistomicina	55
Arlpolieno-fragmento Nrps (Contig 78)	1	27352	-	-
Melanina (Contig 89)	20987	28491	Saframycina A	4
Siderofo (Contig 120)	5412	17178	Desferrioxamina B	83
Butirolactona (Contig 157)	1	10423	Griseoviridina / viridogriseina	13
Siderofo (Contig 165)	8888	18726	Ficellomycina	5
Lasso péptido (Contig 191)	1	14791	Anantina C	50
Ectoina (Contig 207)	429	10848	Ectoina	100
Lantipeptido (Contig 244)	1	13104	SapB	75
Butirolactona (Contig 261)	1	7796	-	-
Melanina (Contig 89)	1534	10533	Melanina	100
Terpeno (Contig 284)	1	10445	Albaflavenona	100
T1pks (Contig 338)	1	8338	Tiacumicina B	12
Bacteriocina (Contig 360)	1	7271	-	-
Otros (Contig 428)	1	5162	-	-

Descripción de los tipos de metabolitos secundarios según antiSMASH: Bacteriocina, incluye bacteriocinas u otra síntesis ribosomal no especificada y clústeres de productos peptídicos modificados post-traducción (RiPP); T1pks, Policetónicos sintasa de tipo 1; T2pks, Policetónicos sintasa de tipo 2; T3pks, Policetónicos sintasa de tipo 3; NRPS, Péptido sintetasa no ribosomal; Otros, clúster que contiene metabolitos secundarios que no se incluyen en ninguna de las categorías anteriormente descritas. La similitud hace referencia al porcentaje de genes homólogos del clúster predicho que están presentes en el clúster más próximo. La caracterización de un gen homólogo, según antiSMASH, se presenta por el alineamiento con la herramienta BLAST con un valor-e <1E-05, un mínimo del 30% de identidad de secuencia y cubriendo al menos un 25% de la secuencia.

La herramienta fue capaz de identificar la presencia del 40% del clúster de genes que participan en la formación del antibiótico 7-prenilisatina, descrito en *Streptomyces* (Wu y col., 2015). Se determinó que la cepa podría contener hasta un 21% del clúster original identificado para la síntesis de fosfazynomicina que se describió originalmente en una cepa de *Streptomyces* (Ogita y col., 1983).

Con un 92% de similitud se ha identificado un clúster de formación del lípido triterpeno pentacíclico, hopeno, precursor de hopanoides que se producen en multitud de bacterias, pero no en arqueas (Sham y col., 1993). Los hopanoides están involucrados en la regulación de la estabilidad y fluidez de la membrana plasmática, pero podrían tener otras funciones debido a sus variaciones estructurales (Kannenberg y col., 1996; Kannenberg y Poralla, 1999). Otros terpenos observados con un 100% de similitud en el estudio de anotaciones de la cepa de estudio fueron la geosmina, 2-metilisoborneol y albaflavenona. Los dos primeros son compuestos causantes del característico olor a tierra (Zaitilin y Watson, 2006). La albaflavenona (Fig. 6.4) es un antibiótico sintetizado por el clúster de dos genes que se ha descrito en varias especies del género *Streptomyces*. Es parcialmente causante de olor producido por las bacterias (Gürtler y col., 1994).

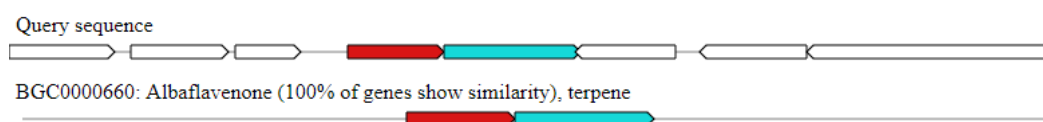


Figura 6.4. Grupo de genes participantes en la síntesis de la albaflavenona identificados por homología con antiSMASH. En rojo, el núcleo de la biosíntesis del antibiótico. En verde, el gen adicional y necesario para la producción del metabolito.

Se comprobó la similitud con varios grupos de péptidos no ribosomales (NRPS) que constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios como antibióticos, agentes anticáncer, toxinas, surfactantes, inmunosupresores, sideróforos y antiinflamatorios (Cane y col., 1998; Cane y Walsh, 1999; Crosa y Walsh, 2002; Masson y col., 2011) que son producidos por enzimas denominadas sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS). Se localizaron los clústeres más cercanos identificados como griseoviridina / viridogriseina, laspartomicina y skyllamycina, con un 5%, 6% y 10% de similitud, respectivamente.

Se identificaron, asimismo, diversos policetónicos de tipo I, II y III. Los policetónicos de tipo I son enzimas multifuncionales organizadas en módulos, cada uno de las cuales alberga un conjunto de distintos dominios responsables de la catálisis de un ciclo de elongación de la cadena de policetónicos. Cada módulo de elongación contiene, al menos, tres dominios,

una aciltransferasa (AT), una proteína transportadora de acilo (ACP) y una β -cetoacil sintasa (KS), que seleccionan, activan y catalizan una condensación de Claisen entre la unidad extensora y la cadena policetónica en desarrollo, generando un intermedio β -cetoacil-S-ACP (Shen, 2003). Los macrólidos se encuentran entre los clasificados en este tipo. El estudio de anotaciones presentó un 12% de similitud con tiacumicina B, un macrólido halogenado sintetizado por un complejo policetónico de tipo I (Xiao y col., 2011). Se observó un 36% del clúster que sintetiza *akaeolide*, un antibiótico de moderada actividad contra *Micrococcus luteus* (Zhou y col., 2015).

Los policetónicos de tipo II son más frecuentes en actinobacterias. La síntesis generalmente comienza con la carga de un precursor α -carboxilado, normalmente acetato, en una proteína portadora de acilo (ACP), que luego se transfiere al sitio activo de una cetosintasa (KS) que posteriormente experimenta un alargamiento iterativo usando malonil-coenzima A (CoA) como unidades de extensión para proporcionar una cadena poli- β -cetónica (Das y Koshla, 2009). El antibiótico tetraciclina o el agente anticancerígeno doxorubicina son ejemplos de los policetónicos de tipo II. Se identificaron un 55% de los genes involucrados en la síntesis de resistomicina, un compuesto con propiedades farmacológicas como la inhibición de la proteasa VIH-1, del virus con el mismo nombre, y actividad contra bacterias Gram positivas y micobacterias (Jakobi y Hertweck, 2004).

Por último, los policetónicos de tipo III son proteínas homodiméricas que se bastan por sí solas para ejecutar los pasos de condensación y ciclación necesarios para producir sus productos fenólicos (Yu y col., 2012). La flaviolina, clúster presente en la cepa de estudio en un 75% de similitud, es un pigmento que protege a los microbios de la radiación UV (Zhao y col., 2005). Presentando un 17% de los genes, se predijo el clúster que sintetiza el antibiótico macrolactamo BE-14106 con actividad antibiótica, antifúngica y antitumoral, aislado originalmente de una cepa de *Streptomyces* (Kojiri y col., 1992). En el *contig* 30 se han localizado genes que podrían participar en la síntesis de diferentes compuestos con distintas propiedades (Fig. 6.5). Por un lado, se han localizado el 31% de similitud con el clúster de genes que participan en la producción de *meroclorina*, un grupo de antibióticos meroterpenoides, originalmente producidos por una bacteria marina del género *Streptomyces* que conforman una configuración híbrida entre policetónicos y terpenos (Kaysser y col., 2013). Se detectaron otros posibles

meroterpenoides de forma alternativa al *merochlorina*, como son dos miembros de la familia *napyradiomicina*, con un 46% y un 35% de similitud de los clústeres que sintetizan este antibiótico. Esto puede sugerir que, si la bacteria presenta un porcentaje de similitud con el clúster de síntesis del metabolito secundario relativamente elevado, podría darse la síntesis de un compuesto distinto pero perteneciente a la misma familia. La comparación de genomas de especies estrechamente relacionadas identifica qué genes están altamente conservados, pero también identifica aquellos únicos en las cepas de interés, lo que puede indicar una variante del clúster de biosíntesis (Blin y col., 2017a). También se determinó la presencia de genes involucrados en la síntesis de furaquinocina A, un híbrido terpeno-policetónico tipo III, y Naphthgeranine A, un policetónico de tipo III, con el 30% y el 60% de similitud con los respectivos clústeres biosintéticos, respectivamente. Es decir, todos los compuestos descritos coinciden en la presencia de determinados genes que los caracterizan en grupos de naturaleza similar, lo que podría reforzar el hecho de estar ante un nuevo clúster de biosíntesis disponible en la cepa de estudio.

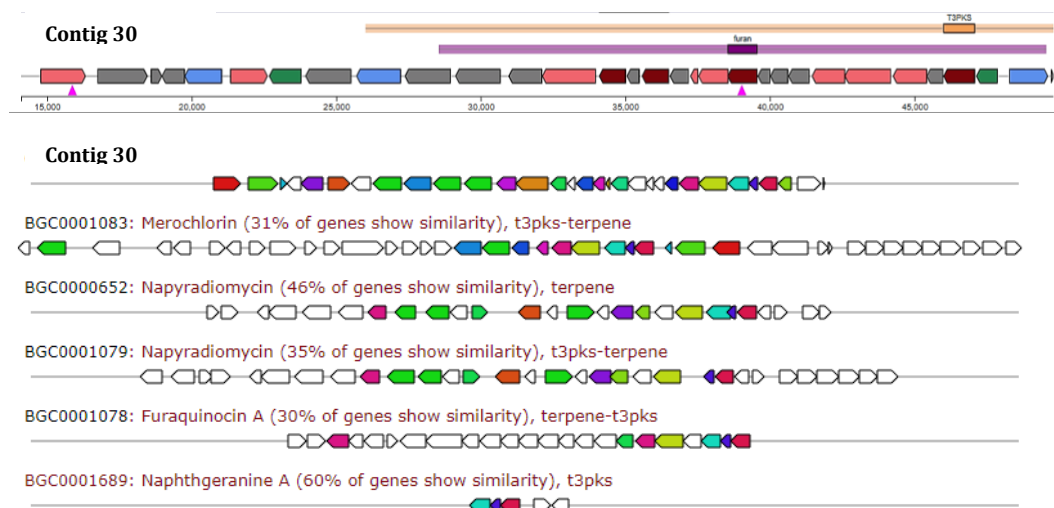


Figura 6.5. Representación de los distintos clústeres de biosíntesis identificados por homología con antiSMASH para el *contig* 30.

Otro grupo abundante en el estudio de anotaciones fueron los sideróforos. Como se indicó anteriormente, estos son compuestos

principalmente sintetizados por miembros de las enzimas de tipo NRPS. No obstante, existen sideróforos sintetizados a través de rutas metabólicas independientes de NRPS (NIS), donde los compuestos son ensamblados por ácidos dicarboxílicos alternativos y diamidas o amino alcoholes unidos por enlaces amida o éster (Challis, 2005). Los sideróforos son compuestos quelantes de alta afinidad por el hierro, y se usan como estrategia por muchos microorganismos patógenos y saprófitos cuando existe una baja biodisponibilidad de hierro (Wandersman y Delepeaire, 2004). Se identificó un 83% de genes involucrados en la síntesis de desferrioxamina B, un sideróforo descrito en *Streptomyces* y que se ha observado que puede funcionar como mecanismo de resistencia ante el antibiótico salmicina, ya que reduce su sensibilidad (Bunet y col., 2006). Se identificaron los clústeres de biosíntesis de los compuestos vibrioferrina y ficellomycina, con un 18% y 5% de similitud, respectivamente.

La producción de ectoína es fundamental para la protección de la célula contra estrés causado por sales, elevadas temperaturas o congelación, desecación, etc., lo que ha atraído la atención de la comunidad científica e industrial por su potencial uso biotecnológico (Lippert y Galinski, 1992; Yusuhikoy col., 1997; Motitschke y col., 2000). Los estudios realizados en distintas bacterias productoras de ectoína, tanto Gram positivas como Gram negativas, han demostrado que el clúster de genes que codifican a las enzimas encargadas de la síntesis de esta molécula, ectABC, está fuertemente conservado (Cánovas y col., 1998; Kuhmann y Bremer, 2002; Reshetnikov y col., 2006). En la cepa de estudio se presenta con un 100% de similitud con el clúster originalmente descrito en *Streptomyces* (Fig. 6.6) (Malin y Lapidot, 1996).

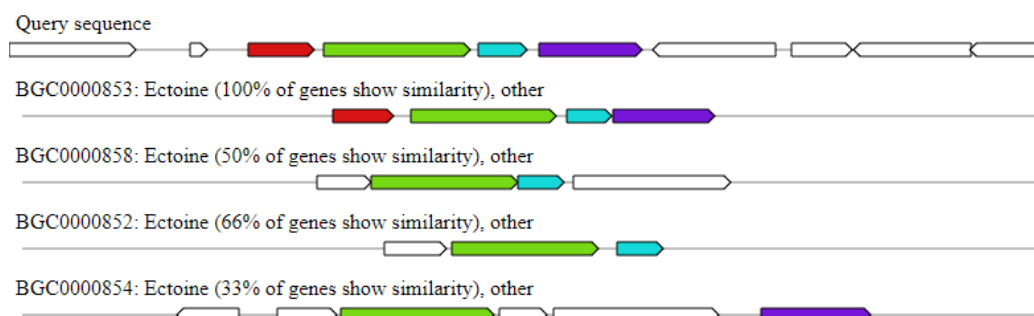


Figura 6.6. Similitud de los genes que participan en la biosíntesis de la ectoína.

Se observaron otros compuestos de distinta naturaleza. Melaninas, lasso péptidos, lantipéptidos y butirolactonas. Los lasso péptidos son péptidos modificados post-traducción (RiPPs) que pueden presentar diferentes actividades como la de inhibir el crecimiento de microbios (Tietz y col., 2017). Se identificó un 50% de los genes que participan en la síntesis de anantina C. Los lantipéptidos son una clase de RiPPs caracterizados por la presencia de aminoácidos con puente tioéter introducidos enzimáticamente, llamados lantioninas y metilantioninas (Dischinger y col., 2014). El compuesto sapB (Fig 6.7) es un antibiótico lantipéptido descrito originalmente en *Streptomyces coelicolor* que es fundamental en la formación del micelio aéreo (Kodani y col., 2004).

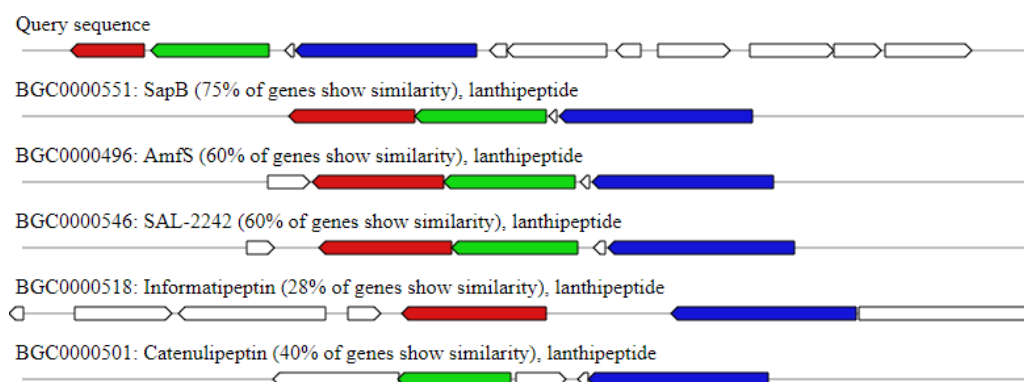


Figura 6.7. Representación de similitudes frente a diferentes lantipéptidos.

Las butilactonas son compuestos de síntesis híbrida entre policetónicos y NRPS. Griseoviridina / viridogriseina son propios de este grupo.

Las entradas bacteriocina y “Otros”, así como las identificaciones en los *contigs* 31 y 78, clasificadas como terpeno y “arlpolieno-fragmento Nrps” son clústeres que podrían tener una función como metabolito secundario, pero para los que no se ha identificado similitud con ninguna referencia en la base de datos.

6.2 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MZ0337C2 Y MZ0348B

El procesamiento de los genomas de MZ0337C2 y MZ0348B para la predicción de genes generó dos archivos en formato *fasta* con las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, para cada genoma. Al igual que sucedió con la cepa MZ0467C, se tomaron los archivos *fasta* para realizar el estudio de anotaciones con Sma3s. Se predijeron 6337 y 6410 secuencias, respectivamente. De estas, se obtuvieron 1562 y 1565 anotaciones que describen la participación de las proteínas en rutas metabólicas, procesos biológicos y en aquellas partes de la célula donde reside su actividad. Concretamente, para MZ0337C2 se predijeron 565 secuencias de proteínas involucradas en rutas metabólicas, mientras que en MZ0348B se predijeron 569 secuencias implicadas (Fig. 6.8).

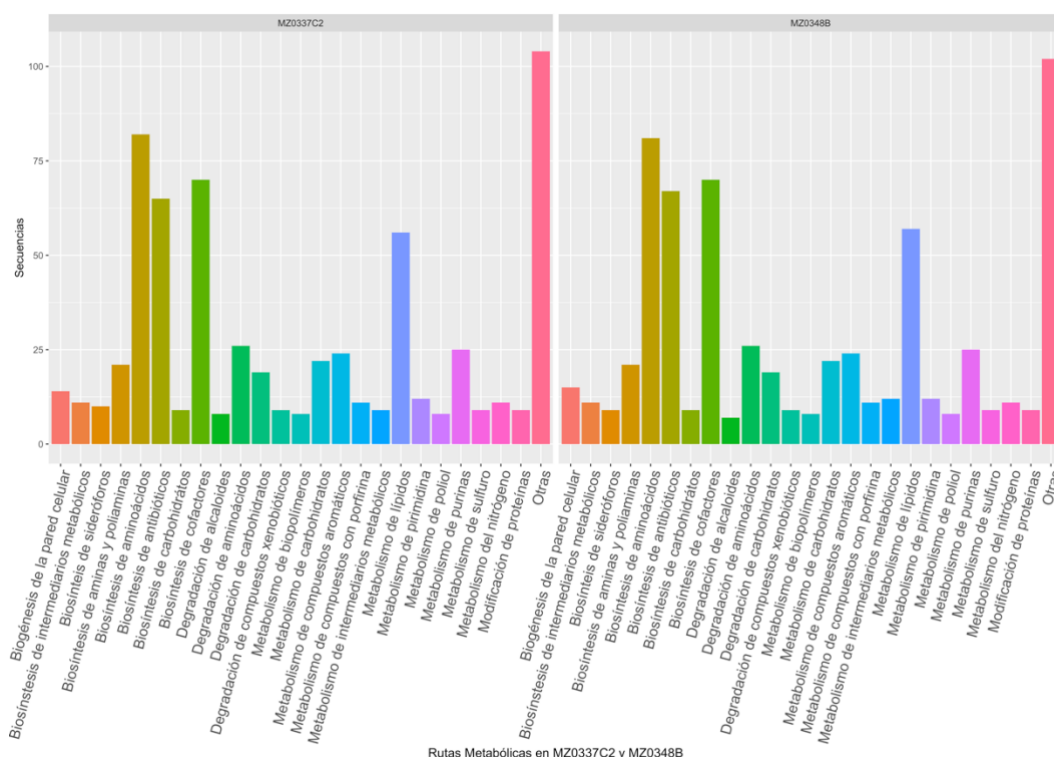


Figura 6.8. Diagrama de barras representando las rutas metabólicas presentes en las cepas MZ0337C2 (izquierda) y MZ0348B (derecha). Se representan aquellas rutas con un peso específico de secuencias predichas de aminoácidos igual o superior al 1% del total. La referencia “Otras” acumula aquellas rutas que poseen un peso específico inferior al 1%.

Las principales rutas metabólicas en las que se observó un mayor número de proteínas en ambas cepas fueron aquellas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos, cofactores, antibióticos, el metabolismo de lípidos y la degradación de aminoácidos, en ese orden. Concretamente, en MZ0337C2 se determinaron 82, 70, 65, 56 y 26, respectivamente, mientras que en MZ0348B fueron 81, 70, 67, 57 y 26, respectivamente. Es decir, en ambas cepas, las rutas metabólicas más abundantes en proteínas coinciden, y el número de estas en cada grupo de rutas metabólicas es muy semejante. Al igual que lo representado para MZ0467C, en el grupo “Otras” se incluyen rutas metabólicas que intervienen en el metabolismo de esteroides, terpenos o fuentes de carbono simple, entre otros, así como biosíntesis de carotenoides esteroides o pigmentos.

En lo referente a aquellas proteínas relacionadas en procesos biológicos, ambas cepas coinciden en el número de secuencias proteicas que

intervienen en estos procesos, concretamente 1500 secuencias para cada bacteria (Fig. 6.9).

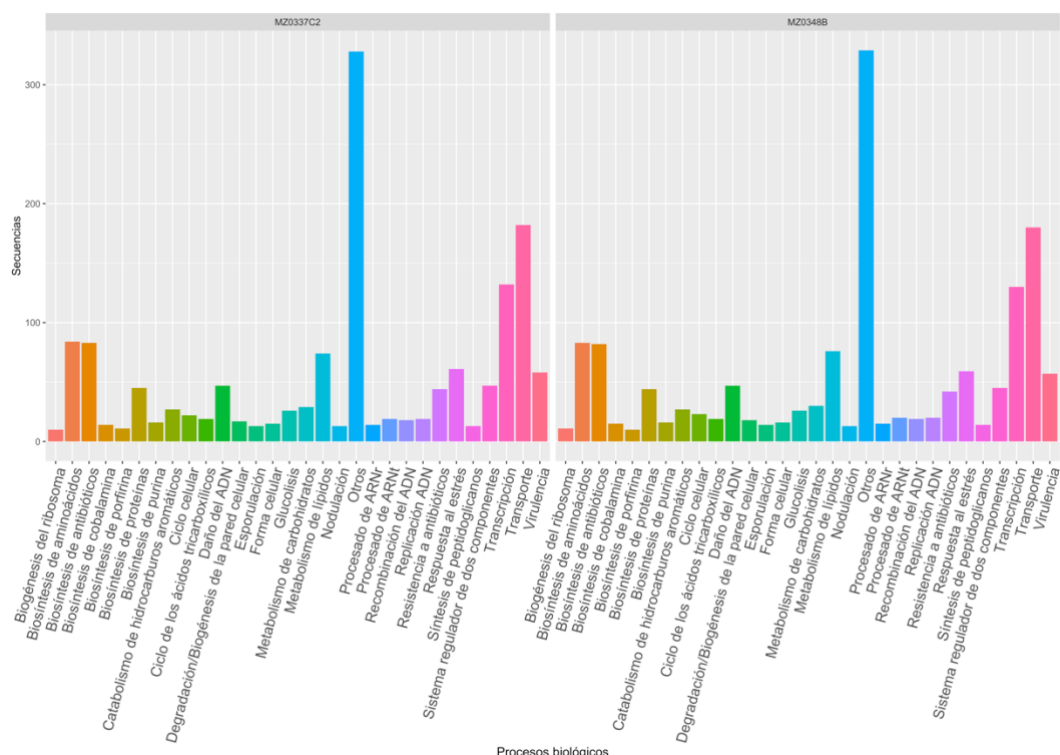


Figura 6.9. Diagrama de barras representando los procesos biológicos en MZ0337C2 y MZ0348B. Se indican los procesos biológicos con un mínimo de 10 secuencias proteicas predichas para la cepa de estudio. La referencia “Otras” incluye a aquellos procesos que poseen 9 o menos secuencias proteicas.

De nuevo, las categorías de procesos biológicos más abundantes en proteínas en ambas cepas coinciden. Concretamente, las relacionadas con el transporte, la transcripción, biosíntesis de aminoácidos, biosíntesis de antibióticos y metabolismo de lípidos fueron los grupos principales de procesos biológicos en ambas bacterias. Así, en MZ0337C2 se predijeron 182, 132, 84, 83 y 74 proteínas, respectivamente, mientras que para MZ0348B fueron 180, 130, 83, 82 y 76 secuencias proteicas, respectivamente. En el grupo definido como “Otras” se incluyen procesos relacionados con la biosíntesis de riboflavinas, fijación del nitrógeno, síntesis de ATP o el metabolismo de fuentes de carbono simple, entre otros.

Para finalizar, se detectaron 675 secuencias de proteínas que se localizaron formando parte de componentes específicos celulares o extracelulares en el caso de MZ0337C2 (Fig. 6.10 A), mientras que para MZ0348B fueron 666 secuencias (Figura 6.10 B).

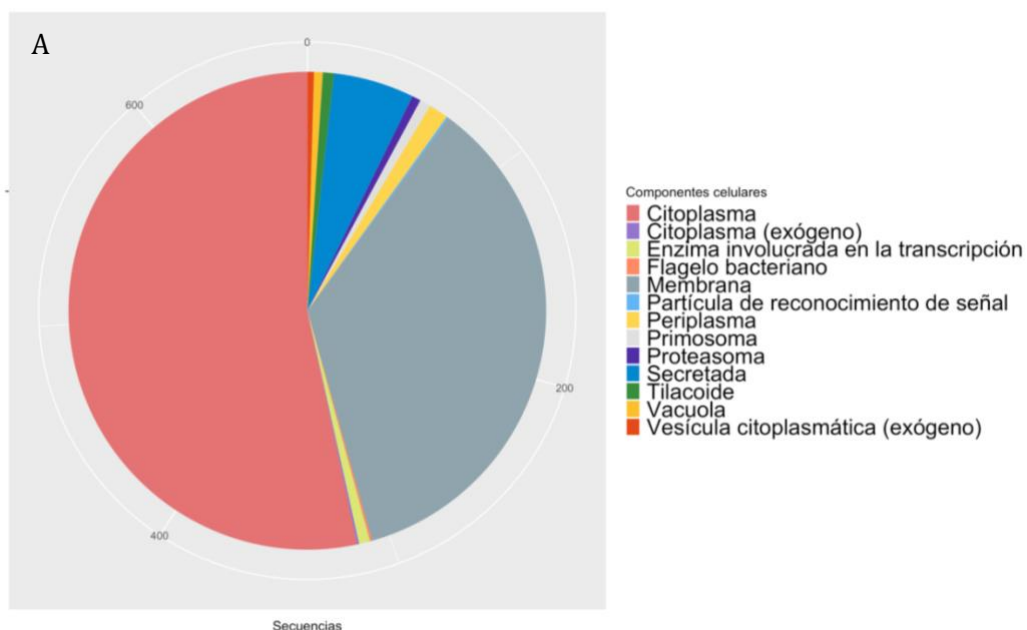
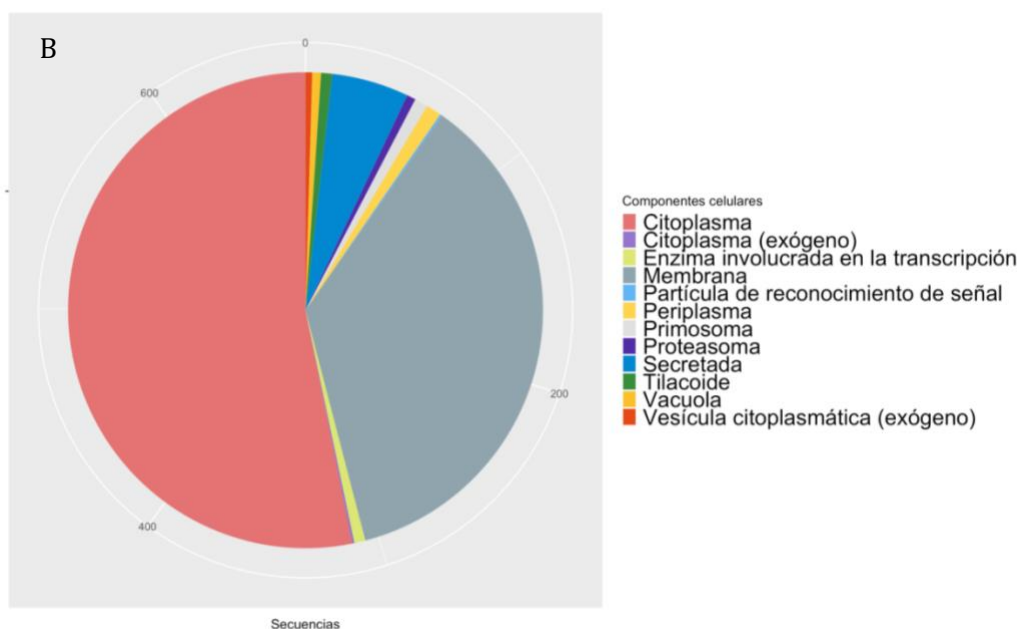


Figura 6.10 A. Gráficos circulares representando las proteínas participantes en los componentes celulares para MZ0337C2. Las referencias marcadas como “exógeno” se refieren a proteínas que, si bien funcionan en dichos componentes celulares de la bacteria, su origen proviene de la inclusión de material genético viral.



6.2.1 RESISTOMAS DE MZ0337C2 Y MZ0348B

Los estudios de los resistomas siguieron la misma metodología utilizada para la cepa MZ0467C, basado en el análisis de las secuencias proteicas predichas por el software prodigal y la caracterización e identificación de estas haciendo uso de la base de datos revisada SWISSProt de Uniprot, presentando una serie de enzimas clasificadas por clases que están involucradas en mecanismos de defensa ante compuestos antibacterianos (Tabla 6.4). No hubo grandes diferencias en la presencia de diferentes mecanismos de resistencia entre ambas cepas, llegándose incluso a calcar en las dos bacterias los valores de similitud con las mismas secuencias proteicas más cercanas en la base de datos. Sí surgieron más diferencias, como cabía esperar, con respecto a la cepa de *Streptomyces* MZ0467C, bacteria que presenta coincidencias con MZ0337C2 y MZ0348B en aquellos mecanismos frecuentes en actinobacterias.

Así, de forma adicional a los mecanismos coincidentes en MZ0467C y ya anteriormente descritos, MZ0337C2 y MZ0348B podrían ser resistentes a

fosfinotricina mediante la actividad de la enzima *fosfinotricina N-acetiltransferasa*, ya que provoca su inactivación por transferencia de un grupo acetilo desde la molécula acetil CoA (Brauer y col., 1988).

El regulador transcripcional TipA de tipo HTH constituye un sistema de resistencia contra numerosos antibióticos tiopeptídicos. Esta proteína ha sido estudiada ya que se cree que su mecanismo de reconocimiento de estos compuestos podría ser común en otras bacterias (Habazettl y col., 2014).

El complejo de resistencia a avilamicina comprende la expresión de dos genes (*aviRa* y *aviRb*) descritos en *Streptomyces viridochromogenes*, que están involucrados en el mecanismo de resistencia contra avilamicina, un antibiótico de la familia de las ortosomicinas (Weitnauer y col., 2001).

La evidencia de la resistencia al cloranfenicol se ha obtenido por homología con la secuencia del gen *catB2* registrada en la base de datos de Uniprot con ficha P26838. También, la expresión del gen *mdtL* a la proteína de multiresistencia *MdtL* confiere resistencia a este antibiótico (Ficha UniProt Q8FBV0). Cabría destacar las diferentes estrategias de resistencia a este antibiótico identificadas en las tres cepas de estudio, donde el MZ0467C presentó una mayor similitud con secuencias descritas en *Streptomyces*, mientras que las secuencias identificadas en MZ0337C2 y MZ0348B hacen referencia a mecanismos distintos descritos en bacterias no actinobacterias.

La *beta clamp GriR* está implicada en la biosíntesis y resistencia del antibiótico griselimicina por parte de *Streptomyces coelicolor* (Kling y col., 2015).

El regulador transcripcional *WhiB7* contribuye en la intrínseca resistencia a diferentes antibióticos en micobacterias (Burian y col., 2012).

La sobreexpresión de la proteína *VraR* en una cepa de *Staphylococcus aureus* confiere resistencia al antibiótico vancomicina (Kuroda y col., 2000). Originalmente tiene una función implícita en el control de la síntesis de peptidoglicanos para la pared celular. Solo presentó un porcentaje de similitud por encima del rango marcado para considerar proteínas homólogas en la cepa MZ0337C2.

Tabla 6.4. Estudio del *resistoma* de MZ0337C2 y MZ0348B, conforme a secuencias incluidas en la base de datos SWISSProt de UniProt.

Enzimas	Resistencia
<i>UDP-4-deoxi-4-formamido-beta-L-arabinosa aminotransferasa</i>	Polimixina
ADN girasas	Novobiocina y otras fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)
Glucosiltransferasas (Macrólidos)	Macrólidos
Beta-lactamasas	Beta-lactámicos
<i>Fosfinotricina N-acetiltransferasa</i>	Fosfinotricina
<i>Undecaprenil-difosfato fosfatasa</i>	Bacitracina
<i>Ligasa lisina-tRNA</i>	Péptidos catiónicos antimicrobianos (PCAs)
Proteína reguladora de resistencia a nosiheptidos	Nosiheptidos (NH)
Regulador transcripcional <i>TipA</i> de tipo HTH	Tiopéptidos
<i>Glutamina sintetasa (GSII)</i>	Bialafos
Complejo de resistencia a avilamicina	Avilamicina
Regulador transcripcional <i>LnrK</i>	Linearmycina
<i>Beta clamp GriR</i>	Griselimycina
<i>Cloranfenicol acetiltransferasa</i>	Cloranfenicol
<i>Proteína MdtL</i>	
<i>Virginiamicina B liasa</i>	Estreptograminas (compuestos clase B)
Regulador transcripcional <i>WhiB7</i>	Antibióticos
¹ Regulador <i>VraR</i>	Vancomicina
<i>Alanina racemasa</i>	Cicloserina
Proteína <i>RbpA</i>	Rifampicina
<i>Ligasa isoleucina-tRNA</i>	Mupirocina
Factor Trigger	Estreptomina

¹ Solo en MZ0337C2

6.2.2 PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN MZ0337C2 Y MZ0348B

6.2.2.1 PREDICCIÓN DE PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS A TRAVÉS DE UNIPROT

Siguiendo la misma metodología utilizada para el estudio del *resistoma* de las cepas MZ0337C2 y MZ0348B, en la Tabla 6.5 se propone la capacidad en las bacterias de producir enzimas o complejos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de antimicrobianos, deducidos por homología a partir de un 40% de similitud entre secuencias comparadas. Del mismo modo que se observó en el estudio del *resistoma*, ambas cepas demostraron disponer de un metabolismo secundario muy similar. Igualmente, comparándolas con MZ0467C, coinciden en mecanismos de síntesis de

antibióticos de distinta naturaleza, como son macrólidos y policetónicos, en general, pero sí muestran diferencias en grupos más específicos.

En el caso de las enzimas involucradas en la síntesis de macrólidos, MZ0348B podría disponer de un mecanismo, no reconocido en las otras cepas de estudio, para la producción del antibiótico FK-506, con actividad inmunosupresora, actuando como molécula precursora de la síntesis (Shafiee y col., 1994).

Se identificaron las secuencias correspondientes con las dos enzimas bromoperoxidasas implicadas en la biosíntesis del antibiótico 7-clorotetraciclina, descrito originalmente en *Streptomyces aureofaciens* (Weng y col., 1992).

Se determinó la presencia de las secuencias de los genes implicados en la síntesis de candidicina, de acuerdo al estudio relacionado con la especie *Streptomyces griseus* de la cual se describió originalmente la ruta de producción del antibiótico (Criado y col., 1993).

Se identificaron los genes implicados en la biosíntesis de fenazina, phzC, phzD, phzE, phzF y phzG, así como el gen phzR que expresa a la proteína reguladora de la producción del antibiótico (Pierson y col., 1994; Mavrodi y col., 1998). Las fenazinas fueron originalmente descritas en *Pseudomonas*, pero también han sido aisladas de cepas de *Streptomyces* en diferentes ecosistemas (Liang y col., 2017; Remali y col., 2017).

Se localizaron por homología las secuencias de las proteínas involucradas en la síntesis de granaticina descrita originalmente en *Streptomyces violaceoruber* (Sherman y col., 1989). Las granaticinas son un grupo de antibióticos policetónicos de la clase benzoisocromanequinona que, junto con las actinorrodinas, es el grupo más conocido de esta clase de policetónicos (Ichinose y col., 1998).

Se identificó el clúster completo de genes que expresan a proteínas del grupo policetónico sintetas involucradas en la síntesis de curamicina, originalmente descritas en *Streptomyces cyaneus* (Bergh y uhlen, 1992).

Se identificaron los genes participantes en la síntesis de la monensina, descritos en *Streptomyces cinnamonensis* (Arrowsmith y col., 1992).

La enzima *linocin-M18* es un compuesto de propiedades antimicrobianas contra un amplio rango de bacterias Gram positivas, entre las que se incluye *Bacillus cereus*. Podría tener actividad proteasa (Valdes-Stauber y Scherer, 1994).

Tabla 6.5. Estudio de síntesis de antimicrobianos en MZ0337C2 y MZ0348B conforme a secuencias incluidas en la base de datos SWISSProt de UniProt.

Enzimas	Antimicrobianos
Bromoperoxidasas 1 y 2	7-clorotetraciclina
Biosíntesis de candicidin	Candicidina
Clúster de síntesis de fenazina	Fenazina
Clúster de síntesis de granaticinas	Granaticinas
Clúster policetónico sintasa curamicin	Curamicina
Clúster policetónico sintasa monensina	Monensina
Valina deshidrogenasa	
¹ O-metiltransferasa MdmC	Macrólidos
FKMT	
Linocin-M18	Linocina
L-glutamina:scyllo-inososa aminotransferasa	Estreptomicina
Mutasa methilmalonil-CoA	Biosíntesis de antibióticos policetónicos
Tiorredoxina reductasa	Penicilinas y cefalosporinas
Tirosina amoniaco liasa	C-1027
Sulfato adenililtransferasa	Mitomicina C

¹ Solo en MZ0348B

6.2.2.2 PREDICCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS MEDIANTE ANTI-SMASH

De forma homóloga al estudio realizado para la cepa MZ0467C, se utilizó antiSMASH para predecir la actividad metabólica secundaria de MZ0337C2 y MZ0348B (Tabla 6.6). Ambas cepas coincidieron en el número de clústeres identificados (29), así como en la producción y similitud de 14 metabolitos secundarios más próximos. También coinciden con la cepa MZ0467C en presentar clústeres para la producción de geosmina, ectoína y hopano. Estos metabolitos caracterizan una gran parte de especies del género *Streptomyces*, especialmente la gesomina (Scholler y col., 2002) y la ectoína (Sadeghi y col., 2014). La predicción de la producción de la ectoína través de los estudios *in silico* de las tres cepas de estudio podría relacionar a este metabolito con la elevada tolerancia a sales observada en los análisis para la determinación de nueva especie realizada en el Capítulo 4.

De los clústeres coincidentes en MZ0337C2 y MZ0348B cabría destacar los metabolitos con una elevada similitud con los metabolitos descritos más próximos. Así, paenibactina presentó un 83% de similitud con las secuencias predichas a partir de *contigs* en ambas cepas, las cuales también podrían encajar como parte de clústeres de dos bacillibactina y una griseobactina, con un 100%, 38% y 29%, respectivamente (Fig. 6.12). Paenibactina es un sideróforo péptido-catecol sintetizado bajo condiciones de escasez de hierro a través de enzimas NRPS (Wen y col., 2011). Está relacionado estructuralmente con bacillibactina (Wilson y col., 2006; Cheng y col., 2007) y griseobactina (Patzner y Braun, 2010).

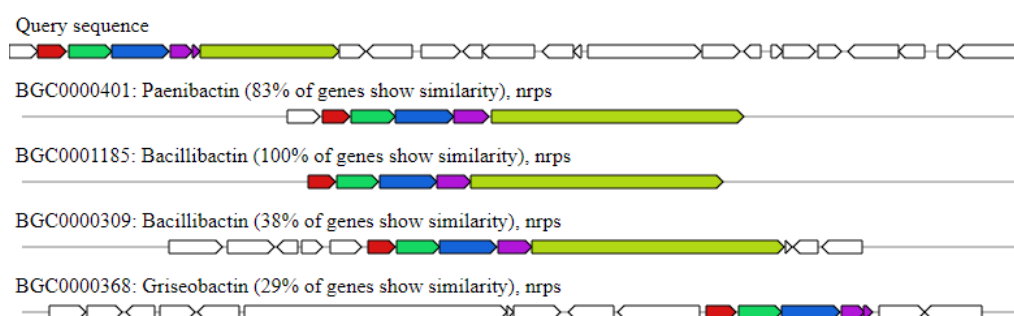


Figura 6.12. Representación de homología entre los genes predichos del *contig* de las cepas MZ0337C2 y MZ0348B, y el clúster de síntesis de paenibactina y otros metabolitos relacionados. La coloración de los genes indica la correspondencia por homología con otros clústeres identificados en la base de datos de antiSMASH.

La pigmentación asociada a la esporulación es una característica común entre miembros del género *Streptomyces*, donde las enzimas policetónico sintetas son las que llevan a cabo la producción de la pigmentación. Desde melaninas hasta otros pigmentos de diferente naturaleza son sintetizados por estas proteínas, conteniendo propiedades adicionales a la propia coloración de las esporas (Omura y col., 2001). Parte de los genes predichos en los *contigs* de las cepas de estudio (Fig. 6.13) que fueron identificados con la producción de pigmentación también podrían corresponderse con el clúster de biosíntesis del antibiótico curamicina, descrito originalmente en *Streptomyces curacoi* (Bergh y Uhlen, 1992).

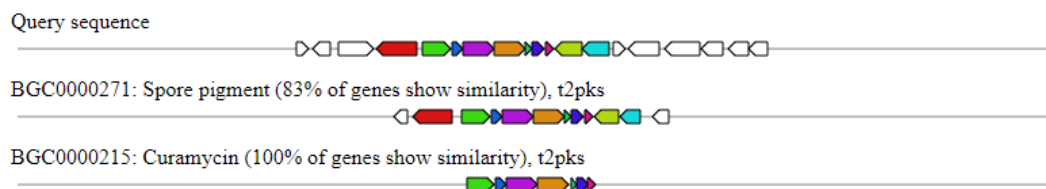


Figura 6.13. Representación de similitudes entre la predicción de genes del *contig* de las cepas MZ0348B y los clústeres de genes para la difusión de pigmento en la esporulación y para la síntesis de curamicina. La representación para MZ0337C2 es homóloga.

La entrada correspondiente con una similitud del 100% con 1-heptadeceno podría inducir a error en la estimación de síntesis de este compuesto por parte de ambas secuencias, ya que la secuencia predicha por antiSMASH en los correspondientes *contigs* de las cepas de estudio es más corta que la secuencia contra la cual alinea para identificar con el 100% de similitud con 1-heptadeceno (Fig. 6.14). No obstante, la escasa cobertura del gen predicho en las cepas de estudio con respecto a la secuencia que sintetiza el metabolito explicaría la baja confiabilidad de la anotación. Otra opción con el mismo porcentaje de similitud con el mismo gen predicho fue la identificación de micromonolactam, un antibiótico macrolactámico derivado de una cepa de *Micromonospora* (Skellam y col., 2013). En este caso la cobertura de la región identificada fue total.

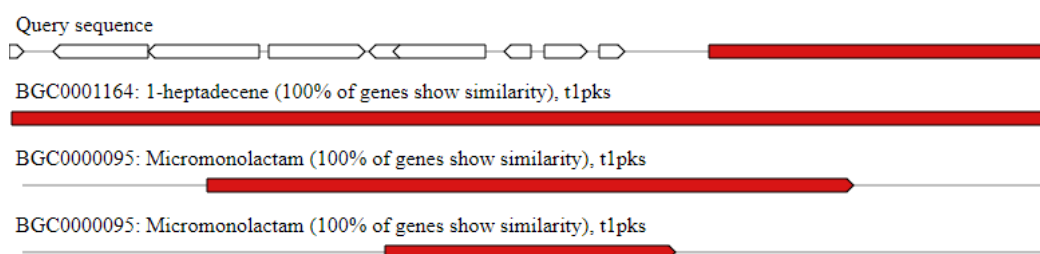


Figura 6.14. Representación de similitudes entre la predicción de genes del *contig* de las cepas MZ0337C2 y MZ0348B, y los clústeres de genes para la síntesis de micromonolactam, según antiSMASH. La representación para MZ0337C2 es idéntica.

De forma similar al caso anterior, se identificó una secuencia, en ambas cepas, que se alineaban con una fracción de una secuencia de la base

de datos más larga que la predicha en este estudio. Se correspondía con la descripción de un grupo de metabolitos de reciente descubrimiento en diferentes especies de *Burkholderiales*, las rhizomidas, cuya actividad es parcialmente desconocida (Wang y col., 2018).

De forma particular, cada cepa de estudio presentó la posibilidad de producir diferentes metabolitos clasificados como policetónicos I, II y III, NRPS, butirolactonas, sideróforos, terpenos, lantipéptidos y bacteriocinas, algunos de ellos con descripciones de clústeres más cercanos identificados. Otros metabolitos no identificados podrían corresponderse con el mismo compuesto en ambas cepas, ya que coinciden de forma aproximada en la longitud de las secuencias predichas por antiSMASH (Tabla 6.6).

A destacar en MZ0337C2, el antibiótico tetronasina y el agente antitumoral BE-7585A, con el 15% y el 26%, respectivamente. Ambos son compuestos policetónicos, de tipo I y II, respectivamente.

Por el contrario, en MZ0348B destacó especialmente el clúster de genes implicados en la síntesis de naringenina, con un 100% de similitud (Fig. 6.15). Se trata de una flavanona antioxidante con actividad antiinflamatoria, quimioprotectora y antitumoral (Jagetia y col., 2007, Cavia-Saiz y col., 2010; Wu y col., 2014). Estos tipos de compuestos son raros en actinobacterias, siendo *Streptomyces clavuligerus* el primer miembro de este grupo donde se describió la naringenina (Álvarez-Álvarez y col., 2010).

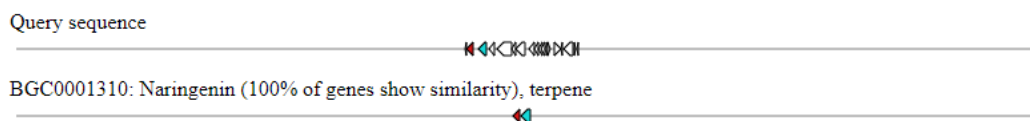


Figura 6.15. Representación de similitudes entre la predicción de genes del *contig* de las cepas MZ0348B, y los clústeres de genes para la síntesis de naringenina.

Otros clústeres relacionados con metabolitos secundarios policetónicos y NRPS fueron identificados en MZ0348B, con menor similitud.

Tabla 6.6. Clústeres de genes que codifican para metabolitos secundarios en MZ0337C2 y MZ0348B.

Cepa	Tipo	Contig	Desde (pb)	Hasta (pb)	Clúster más próximo	Similitud (%)
MZ0337C2	Lasso	(Contig 1)	1837	92767		
MZ0348B	péptido,NRPS,β-lactámico	(Contig 2)	1831	92761	Kirromycina	8
MZ0337C2	NRPS	(Contig 2)	1	29470	Paenibactina	83
MZ0348B		(Contig 1)	1	29480		
MZ0337C2	Terpeno	(Contig 4)	50733	69794	Ebelactona	8
MZ0348B		(Contig 166)	1	11372		5
MZ0337C2	Butirolactona	(Contig 19)	12947	23846	Fluostatina	3
MZ0348B		(Contig 13)	16354	26839		
MZ0337C2	NRPS	(Contig 28)	1	30300	Laspartomycina	13
MZ0348B		(Contig 16)	5664	35948		
MZ0337C2	Terpeno	(Contig 59)	1	24471	Hopeno	61
MZ0348B		(Contig 36)	1	24463		
MZ0337C2	T1pks	(Contig 83)	1	21005	C-1027	9
MZ0348B		(Contig 27)	1	26575		
MZ0337C2		(Contig 88)	11937	19884	Ectoína	100
MZ0348B	Ectoína	(Contig 266)	1	7649		
MZ0337C2		(Contig 94)	1	19199	Pigmentación de esporas	83
MZ0348B	T2pks-Bacteriocina	(Contig 58)	1	19191		
MZ0337C2		(Contig 116)	1	12744	Geosmina	100
MZ0348B	Terpeno	(Contig 88)	1	12732		
MZ0337C2		(Contig 130)	1	7852	Lactonamycina	5
MZ0348B	Butirolactona	(Contig 96)	1	7905		
MZ0337C2		(Contig 186)	1	11442	Cinnamycina	9
MZ0348B	NRPS	(Contig 164)	1	11422		
MZ0337C2		(Contig 254)	1	8338	1-Heptadeceno	100
MZ0348B	T1pks	(Contig 242)	1	8394		
MZ0337C2		(Contig 655)	1	1408	Rhizomida A / rhizomida B / rhizomida C	100
MZ0348B	NRPS	(Contig 799)	1	1672		
MZ0337C2	T1pks	(Contig 54)	1	25856	Tetronasina	15
	T2pks	(Contig 62)	1	24276	BE-7585A	26
	Terpeno	(Contig 64)	9599	23911	-	-
	NRPS	(Contig 86)	1	20508	-	-
	NRPS	(Contig 97)	1	18514	Rimosamida	14
	Sideróforo	(Contig 115)	1	7760	-	-
	Lantipeptido	(Contig 188)	1	11374	-	-
	NRPS	(Contig 189)	1	11336	Surugamida A / surugamida D	9
	Bacteriocina	(Contig 321)	718	6760	-	-
	T3pks	(Contig 431)	1	4473	-	-
	Sideróforo	(Contig 467)	1	3728	-	-
	NRPS	(Contig 513)	1	3023	-	-
	NRPS	(Contig 580)	1	2206	-	-
	Sideróforo	(Contig 588)	1	2115	-	-
	Sideróforo	(Contig 613)	1	1810	-	-

Cepa	Tipo	Contig	Desde (pb)	Hasta (pb)	Clúster más próximo	Similitud (%)
MZ0348B	T2pks	(Contig 41)	1	2278	Rabelomycina	25
	NRPS	(Contig 51)	1	20461	-	-
	T3pks	(Contig 75)	1	17336	Naringenina	100
	T1pks	(Contig 76)	1	17328	Lydicamycina	32
	Bacteriocina	(Contig 101)	9445	15449	-	-
	Sideróforo	(Contig 133)	1	6876	-	-
	NRPS	(Contig 160)	1	11523	-	-
	NRPS	(Contig 165)	1	11403	Syngomycina	17
	Lantipeptido	(Contig 168)	1	11338	-	-
	Terpeno	(Contig 239)	1	8536	-	-
	NRPS	(Contig 299)	1	7009	-	-
	Sideróforo	(Contig 544)	1	3727	-	-
	NRPS	(Contig 730)	1	2117	-	-
	Sideróforo	(Contig 844)	1	1298	-	-
	Sideróforo	(Contig 931)	1	1089	-	-

Descripción de los tipos de metabolitos secundarios según antiSMASH: Bacteriocina, incluye bacteriocinas u otra síntesis ribosomal no especificada y clústeres de productos peptídicos modificados post-traducción (RiPP); T1pks, Policetónicos sintasa de tipo 1; T2pks, Policetónicos sintasa de tipo 2; T3pks, Policetónicos sintasa de tipo 3; NRPS, Péptido sintetasa no ribosomal; Otros, clúster que contiene metabolitos secundarios que no se incluyen en ninguna de las categorías anteriormente descritas. La similitud hace referencia al porcentaje de genes homólogos del clúster predicho que están presentes en el clúster más próximo. La caracterización de un gen homólogo, según antiSMASH, se presenta por el alineamiento con la herramienta BLAST con un valor-e <1E-05, un mínimo del 30% de identidad de secuencia y cubriendo al menos un 25% de la secuencia.

El estudio de la genómica funcional de los microorganismos que colonizan los ecosistemas subterráneos, entre los que se encuentran los tubos de lava, y muy especialmente, el estudio de nuevas especies descritas en estos ambientes poco explorados, supone la posibilidad de descubrir nuevos recursos a disposición de los seres humanos que ayuden en la resolución de los actuales problemas para el medio ambiente y la salud. De este modo, el desarrollo de nuevas tecnologías y metodologías, así como la evolución de las ya existentes, resulta fundamental para la consecución de estos objetivos. La aparición de las ciencias *ómicas* y su impulso como herramientas clave en estos estudios biológicos, no podría haber sucedido sin la evolución y aparición de las tecnologías de secuenciación masiva.

CAPÍTULO 7

PRODUCCIÓN DE BIOCOMPUESTOS ANTIBACTERIANOS Y ANTIFÚNGICOS

7.1 NUEVAS ESPECIES DE *STREPTOMYCES*: ENSAYOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE CRECIMIENTO PARA BACTERIAS Y HONGOS

Se analizó la capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos por parte de las cepas de bacterias susceptibles de describirse como nuevas especies aisladas en la presente tesis doctoral. Con ello se pretende sugerir a los tubos de lava como fuente de recursos de origen microbiológico para su potencial uso en biotecnología.

7.1.1 CAPACIDAD PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS

El estudio de inhibición del crecimiento de bacterias se llevó a cabo utilizando diferentes cepas aisladas en la presente tesis doctoral, clasificadas en los filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes*. El ensayo se dividió en tres fases:

- 1) Ensayo para cribado inicial de grupos resistentes.
 - a. Descarga de biomasa y arrastre hacia zona de interacción entre dos cepas en la misma placa de cultivo.
 - b. Siembra en círculos de MZ0467C con 24 horas de antelación a la siembra de las cepas para probar la viabilidad de crecimiento bajo influencia de la bacteria objetivo del ensayo.
- 2) Viabilidad la actividad antibiótica según la edad del cultivo.
- 3) Efectos en la inhibición del crecimiento de las bacterias por la presencia/ausencia de glicerol y sales en los cultivos de crecimiento de las cepas de *Streptomyces*.

Tabla 7.1. Inhibición del crecimiento de las cepas ensayadas por parte de MZ0467C .

Filo	Cepas	MZ0467C
<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> (MZ0482B)	+
	<i>Rhodococcus</i> . (MZ0480B1)	+
	<i>Microbacterium</i> . (MZ0435B)	+
	<i>Pseudarthrobacter</i> . (MZ0459B2)	+
	<i>Arthrobacter</i> . (MZ0430B1)	+
	<i>Streptomyces</i> . (MZ0421C)	-
	¹ <i>Kocuria</i> sp.	+
<i>Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> . (MZ04101C)	+
	<i>Acinetobacter</i> . (MZ0429B)	-
	<i>Pseudomonas</i> . (MZ0481B)	-
	<i>Cupriavidus</i> . (MZ0462C)	-
	¹ <i>Escherichia coli</i> CET 433	-
<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus</i> . (MZ0478B1)	+
	<i>Paenibacillus</i> (MZ0478B2)	+

¹ Cepas bacterianas no aisladas en la presente tesis doctoral

7.1.1.1 ENSAYO PARA CRIBADO INICIAL DE BACTERIAS SENSIBLES A LA PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS POR PARTE DE LAS CEPAS MZ0467C, MZ0337C2 Y MZ0348B

El procedimiento seguido consistió en enfrentar a dos cepas bacterianas de forma que la biomasa se descargara en márgenes extremos de la placa de cultivo de agar nutritivo con magnesio y glicerol (NA-Mg-G), para ir arrastrando dicha biomasa hacia una zona de interacción entre ambas. Se utilizó biomasa de cultivos con cuatro días de crecimiento, realizando la siembra de las cepas a enfrentar el mismo día. La primera fase excluyó a MZ0337C2 y MZ0348B en la continuación de los ensayos para producir compuestos que inhibiesen el desarrollo de bacterias probados para tal fin, ya que no se observó la capacidad productora de antimicrobianos con esta aproximación.

Como resultado del primer ensayo se observó que MZ0467C presentaba capacidad antimicrobiana para los géneros *Arthrobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Sphingomonas* y *Paenibacillus* (Fig. 7.1). Con ello, se pretendía realizar un sondeo inicial a través del cual se pudo determinar la capacidad de MZ0467C de inhibir el crecimiento de las bacterias clasificadas en estos géneros. Debido a la lentitud de crecimiento de la bacteria de estudio, las cepas frente a las que se probó la inhibición de su crecimiento crecían antes de que MZ0467C pudiera

activar su metabolismo secundario para la producción de antimicrobianos. Por lo tanto, fue gracias a los restos de biomasa provenientes del cultivo consolidado utilizado para la resiembra de esta cepa en las placas de cultivo de interacción con las bacterias seleccionadas donde la capacidad antimicrobiana de MZ0467C se hizo patente.

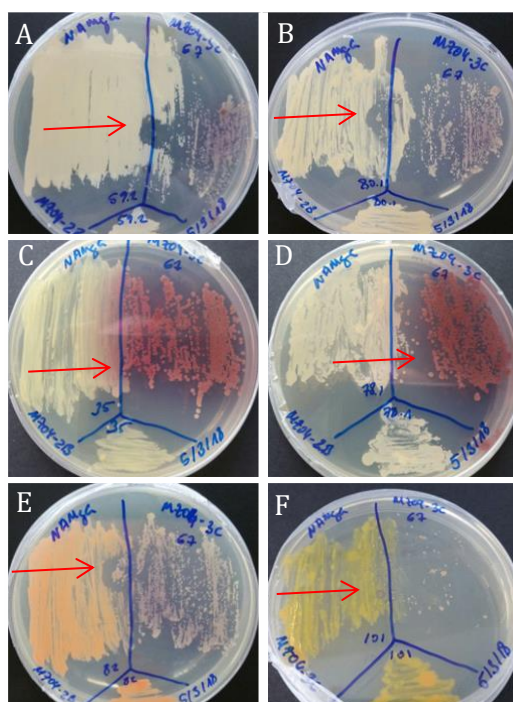


Figura 7.1. Evidencias de inhibición del crecimiento de bacterias por parte de la cepa MZ0467C en diferentes fases temporales. *Pseudarthrobacter* sp. MZ0459B2 (A, 48 horas), *Rhodococcus* sp. MZ0480B1 (B, 48 horas), *Microbacterium* sp. MZ0435B (C, 96 horas), *Paenibacillus* sp. MZ0478B1 (D, 96 hora), *Rhodococcus* sp. MZ0482B (E, 48 horas) y *Sphingomonas* sp. MZ04101C (F, 24 horas).

No se observó inhibición del crecimiento en la interacción con cepas de los géneros *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Streptomyces* (Fig. 7.2). El diseño del ensayo podría haber sido el factor determinante para no inhibir el crecimiento de estas bacterias por parte de la cepa de estudio, ya que tampoco MZ0337C2 y MZ0348B mostraron capacidad para inhibir las bacterias ensayadas, cuando los análisis bioinformáticos predijeron mecanismos de síntesis de antimicrobiales. Por otra parte, que las cepas del género *Streptomyces* crecieran bajo la interacción de MZ0467C podría

indicar, además, que disponían de mecanismos de resistencia ante los antibióticos propios producidos por este grupo.

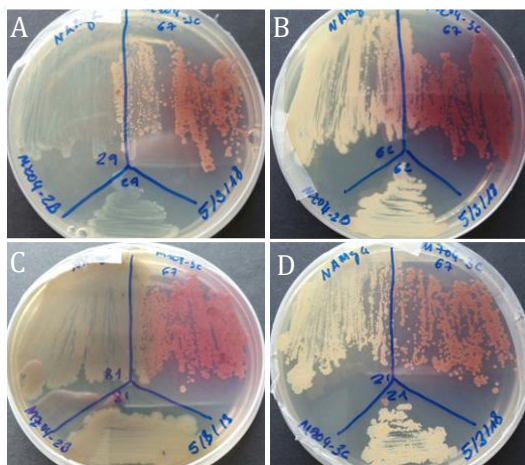


Figura 7.2. Resultados negativos para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas. *Acinetobacter* sp. MZ0429B (A), *Cupriavidus* sp. MZ0462C (B), *Pseudomonas* sp. MZ0481B (C) y *Streptomyces* sp. MZ0421C (D).

En aquellas placas donde no se produjo inhibición de crecimiento de las bacterias se observó que, o bien no se producía transferencia de pigmentación por parte de MZ0467C hacia la biomasa de la cepa contraria, o se apreciaba coexistencia de ambas bacterias sin la influencia de la posible producción de metabolitos secundarios.

MZ0467C tarda entre dos y tres días en crecer, momento en el que las colonias de la bacteria van aumentando de tamaño y se comienza a detectar la difusión del pigmento violeta. Esta ralentización en el crecimiento, junto con un desarrollo de la biomasa de las bacterias a interaccionar más prematuro, impedía comprobar adecuadamente el alcance de la actividad antimicrobiana de la cepa de estudio. Por ello se diseñó una segunda propuesta consistente en sembrar con 24 horas de antelación a MZ0467C para dar cierta ventaja antes de que se produjera el crecimiento óptimo de las cepas a interaccionar (Fig. 7.3).

Fue en este punto cuando se incluyó una cepa ambiental del género *Kocuria*, un grupo que forma parte de las denominadas “actinobacterias

raras”, caracterizadas por un conjunto de géneros que podrían suponer un nuevo foco de estudio para la obtención de biocompuestos de interés biotecnológico (Tiwari y Gupta, 2012). *Kocuria* es un género con especies capaces de producir antibióticos (Palomo y col., 2013) y con propiedades interesantes para su estudio en estrategias de biorremediación (Karnwal, 2018), pero es principalmente conocido por presentar especies patógenas (Kim y col., 2018; Edouard y col., 2018; Manzoor y col., 2018).

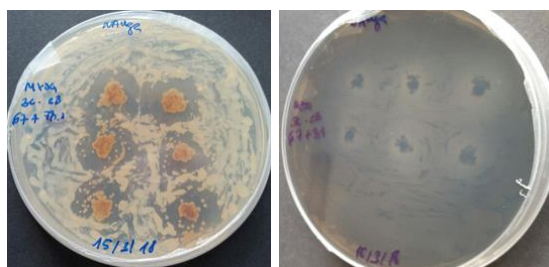


Figura 7.3. Segunda aproximación para medir la capacidad antimicrobiana de MZ0467C. Se sembró la cepa de estudio 24 horas antes de sembrar en la misma placa a aquellas cepas a interaccionar. A la izquierda, ensayo positivo con *Paenibacillus* sp. MZ0478B1. A la derecha, ensayo negativo con *Pseudomonas* sp. MZ0481B.

7.1.1.2 VIABILIDAD DEL EFECTO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO SEGÚN LA EDAD DEL CULTIVO DE MZ0467C

Una vez quedó patente la capacidad de producir compuestos antimicrobianos por parte de MZ0467C, se realizó un tercer análisis para medir la horquilla temporal entre la cual la bacteria mantiene la actividad antibiótica.

Para ello, se prepararon cultivos con medio TSA a los que se les añadió diferentes cultivos crecidos entre 24 y 48 horas de cepas de *Microbacterium* sp. MZ0435B, *Kocuria* sp., *Escherichia coli* CECT^T 433, *Sphingomonas* sp. MZ04101C y *Pseudarthrobacter* sp. MZ0459B2. Una vez se preparó el medio de cultivo junto con estas bacterias, se extrajeron circunferencias de 5 mm de diámetro del cultivo crecido en medio NA-Mg-G de la cepa MZ0467C crecida de tres días, diez días y un mes. Estas muestras de la bacteria de estudio se colocaron de tal manera que la biomasa contactara con el medio de cultivo preparado junto con cada una de las cepas a determinar su inhibición de crecimiento bajo la influencia de MZ0467C. Adicionalmente se utilizó la cepa

Streptomyces coelicolor A3(2), reconocida por su capacidad para sintetizar biocompuestos, a modo de control positivo. Se prepararon cultivos líquidos con medios TSB y NB-Mg-G (Fig. 7.4). MZ0467C se cultivó en ambos medios líquidos, mientras que *S. coelicolor* únicamente en TSB.

El ensayo determinó un margen temporal entre las 72 horas y los diez días de madurez del cultivo en medio NA-Mg-G. La efectividad de la cepa en medio NB-Mg-G fue parcial y nula en la biomasa obtenida del cultivo en TSB, ambos tras siete días de cultivo. En todos los casos la capacidad antimicrobiana sobre *E. coli* fue inexistente. El cultivo con una antigüedad de un mes perdió toda capacidad para inhibir el crecimiento de las bacterias en ensayo. Con la cepa de *S. coelicolor* se observaron resultados semejantes a los obtenidos por MZ0467C, es decir, positivos para el cultivo sólido, negativo para el cultivo líquido y negativa actividad sobre *E. coli* de ambos.

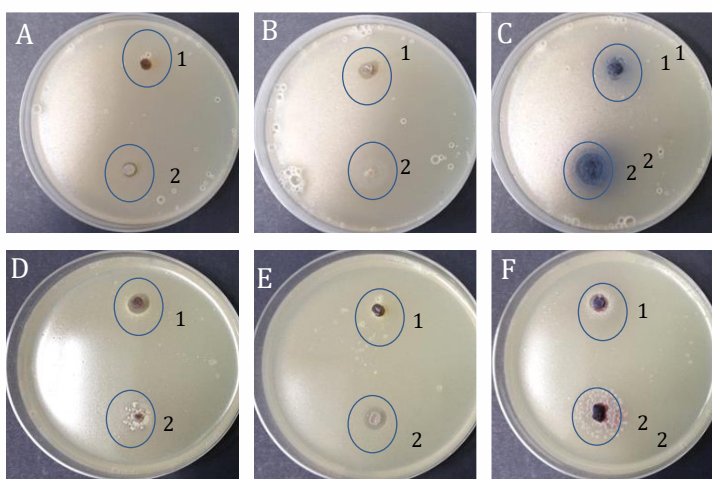


Figura 7.4. Inhibición de bacterias por parte de MZ0467C a diferentes edades de cultivo. Imágenes tomadas 24 horas después de comenzar el ensayo. (A1): Un mes, negativo en *Pseudarthrobacter*. **(A2):** 72 horas, positivo en *Pseudarthrobacter*; **(B1):** Diez días, positivo en *Pseudarthrobacter*. **(B2):** Cultivo líquido TSB de siete días, negativo en *Pseudarthrobacter*; **(C1):** *S. coelicolor*, 72 horas, positivo en *Pseudarthrobacter*. **(C2):** *S. coelicolor* cultivo líquido TSB de siete días, negativo en *Pseudarthrobacter*; **(D1):** Diez días, positivo en *Kocuria*. **(D2):** Cultivo líquido NB-Mg-G de siete días, parcialmente positivo en *Kocuria*; **(E1):** Un mes, negativo en *Kocuria*. **(E2):** 72 horas, positivo en *Kocuria*; **(F1):** *S. coelicolor*, 72 horas, positivo en *Kocuria*. **(F2):** *S. coelicolor*, cultivo líquido TSB de siete días, negativo en *Kocuria*;

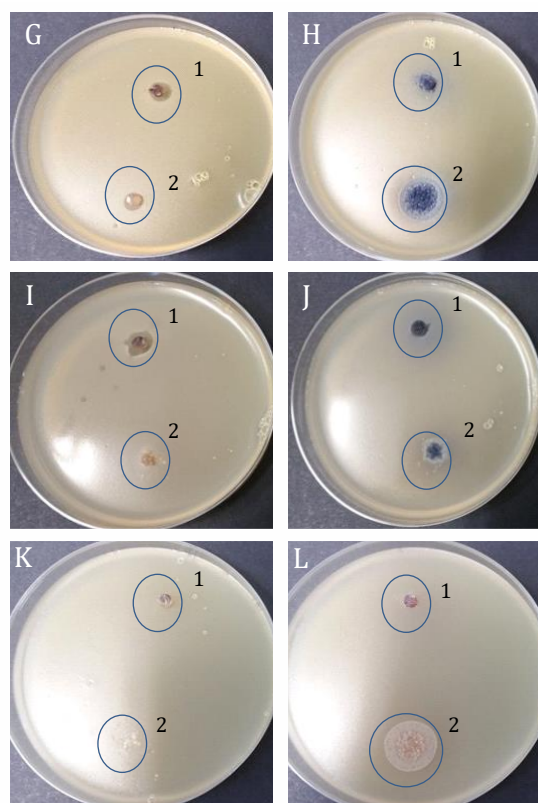


Figura 7.4. (Continuación) (G1): Diez días, positivo ante *Microbacterium*. (G2): 72 horas, positivo ante *Microbacterium*; (H1): *S. coelicolor*, 72 horas, positivo ante *Microbacterium*. (H2): *S. coelicolor*, cultivo líquido TSB de siete días, negativo ante *Microbacterium*; (I1): Diez días, positivo ante *Sphingomonas*. (I2): Cultivo líquido NB-Mg-G de siete días, negativo ante *Sphingomonas*; (J1): *S. coelicolor*, 72 horas, positivo ante *Sphingomonas*. (J2): *S. coelicolor*, cultivo líquido TSB de siete días, negativo ante *Sphingomonas*; (K1): Diez días, negativo ante *E. coli*. (K2): Cultivo líquido TSB de siete días, negativo ante *E. coli*; (L1): *S. coelicolor*, 72 horas, negativo ante *E. coli*. (L2): *S. coelicolor*, cultivo líquido TSB de siete días, negativo ante *E. coli*;

7.1.1.3 INFLUENCIA DEL GLICEROL Y NaCl EN LA PRODUCCIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los diferentes resultados obtenidos con los cultivos líquidos de NB-Mg-G y TSA, motivaron el diseño de un cuarto ensayo orientado a determinar la capacidad de MZ0467C para producir antimicrobianos bajo la influencia de glicerol y cloruro sódico. En esta ocasión se utilizaron las mismas bacterias del anterior ensayo, a excepción de *E. coli*, con las que probar la actividad antibiótica de la cepa de estudio. Los cultivos para el crecimiento de MZ0467C fueron preparados añadiendo glicerol y NaCl, por separado, así como incluidos en un mismo medio de cultivo.

La relación entre la presencia de cloruro sódico y la producción de agentes antimicrobianos en ciertas bacterias ha sido anteriormente abordada por diferentes autores (Leroy y de Vuyst, 1999; Naysens, 2003; Verluyten y col., 2004). Igualmente, en *Streptomyces* se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de NaCl añadidas en los medios de cultivo utilizados, observando una manifiesta reducción en la síntesis de antibióticos por parte de los microorganismos en aquellos ensayos con elevada concentración de esta sal (Singh y col., 2009; Ripa y col., 2009). Radhakrishnan y colaboradores (2015) observaron una menor producción de la pigmentación relacionada con la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* MTCC96 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, producida por una cepa de *Streptomyces*, en concentraciones elevadas de NaCl.

De igual forma, numerosos estudios han analizado la influencia de glicerol en la producción de antibióticos por parte de determinadas bacterias (Shekar y col., 2011; Singh y col., 2017; Roncevic y col., 2018). Bellão y colaboradores (2013) observaron una relación directa entre el uso de glicerol y la producción de ácido clavulánico, cuya producción en MZ0467C ha sido predicha (Capítulo 6), y cefamicina C, en *Streptomyces clavuligerus*.

Como resultado del ensayo acometido en la presente tesis (Tabla 7.2), se observó una mayor producción de pigmentación en ausencia de NaCl en el medio de cultivo. A la vez, una mayor concentración de glicerol con respecto a NaCl favoreció la aparición del pigmento, pero en ningún momento se alcanzó el nivel de difusión alcanzado en el medio en presencia de glicerol con ausencia total de NaCl.

Tabla 7.2. Producción de pigmento violeta por parte de la cepa MZ0467C. Se indican las composiciones de los medios de cultivo donde se apreció una producción del pigmento máxima (+++), buena (++), deficiente (+) y ausente (-).

Medio de cultivo	Producción de pigmentación
NA-Mg-G	+++
TSA	+
TSA-G	++
TSA-Na-Mg	-
TSA-Na-Mg-G	-

De esta forma se comprobó la relación entre la presencia de pigmento y la actividad antimicrobiana de la cepa de estudio, no produciéndose halos de inhibición en aquellos cultivos donde la ausencia de pigmento se hizo patente (Tabla 7.3 y Fig. 7.5 y 7.6). La difusión de pigmentos en bacterias, y más específicamente, por parte del género *Streptomyces* ha sido ampliamente estudiada por su directa relación con la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos (Yamazaki, 1968; Otani y col., 1974; Mikami y col., 1991; Chi y col., 2011).

Tabla 7.3. Inhibición del crecimiento de *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Kocuria* y *Sphingomonas* según los medios de cultivo utilizados con MZ0467C.

Medio de cultivo	Inhibición del crecimiento
NA-Mg-G	<i>Microbacterium</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> y <i>Sphingomonas</i>
TSA	-
TSA-G	<i>Microbacterium</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> y <i>Sphingomonas</i>
TSA-Na-Mg	-
TSA-NA-Mg-G	-

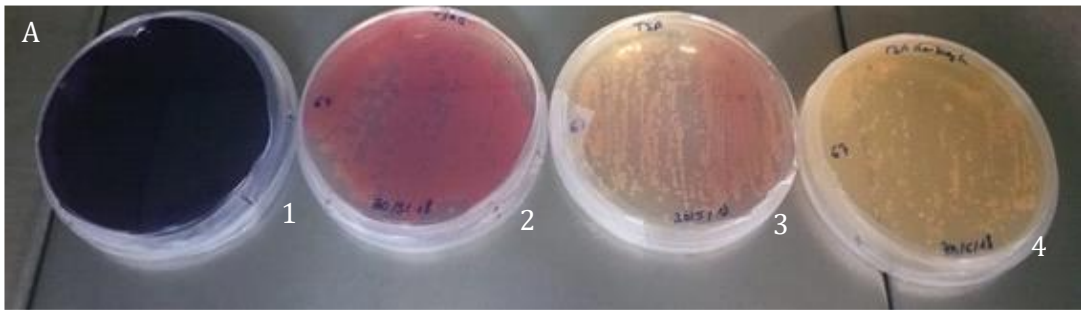


Figura 7.5. Producción de pigmento violeta por parte de MZ0467C según las configuraciones de los medios de cultivo. (A1): NA-Mg-G; (A2): TSA-G; (A3): TSA; (A4): TSA-Na-Mg; TSA-Na-Mg-G presentó la misma ausencia de pigmentación, al igual que (A4)

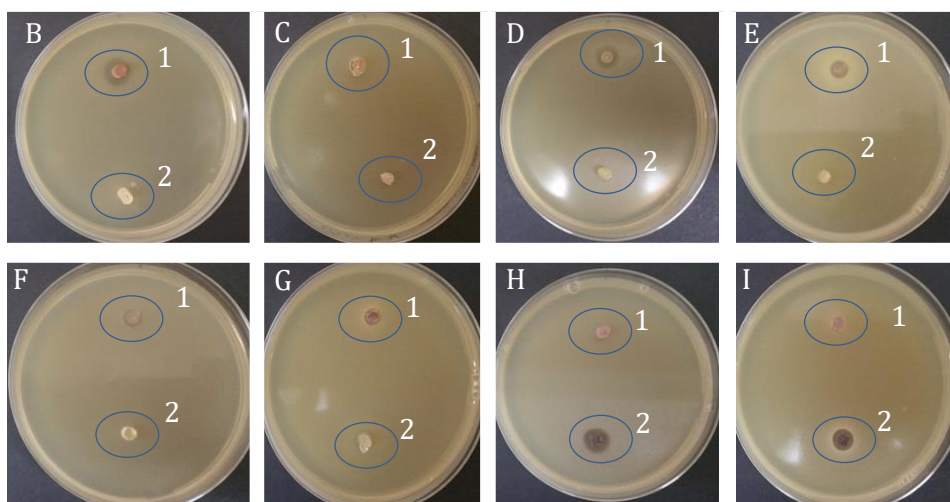


Figura 7.6. Capacidad antimicrobiana de MZ0467C crecida en los distintos medios de cultivo. (B1): TSA-G, inhibición de *Pseudarthrobacter* positiva; (B2): TSA-Na-Mg, inhibición de *Pseudarthrobacter* negativa; (C1): TSA-G, inhibición de *Sphingomonas* positiva; (C2): TSA-Na-Mg, inhibición negativa. (D1): NA-Mg-G, inhibición de *Pseudarthrobacter* positiva; (D2): TSA, inhibición de *Pseudarthrobacter* negativa; (E1): NA-Mg-G, inhibición de *Kocuria* positiva; (E2): TSA, inhibición de *Kocuria* negativa; (F1): NA-Mg-G, inhibición de *Sphingomonas* positiva; (F2): TSA, inhibición de *Sphingomonas* negativa; (G1): NA-Mg-G, inhibición de *Microbacterium* positiva; (G2): TSA, inhibición de *Microbacterium* negativa; (H1): TSA-Na-Mg-G, inhibición de *Pseudarthrobacter* negativa; (H2): NA-Mg-G, inhibición de *Pseudarthrobacter* positiva; (I1): TSA-Na-Mg-G, inhibición de *Kocuria* negativa; (I2): NA-Mg-G, inhibición de *Kocuria* positiva.

7.1.2 CAPACIDAD PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE HONGOS

Siguiendo una metodología similar a la utilizada para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias por parte de las cepas MZ0467C, MZ0337C2 y MZ0348B, se diseñó un ensayo para determinar la capacidad de estas cepas bacterianas para inhibir el crecimiento de cepas de hongos aisladas en la presente tesis doctoral (Tabla 7.4 y Fig. 7.7). En este caso se sembraron las tres cepas de estudio en la misma placa para ensayar su capacidad de inhibir el crecimiento de cada uno de los hongos utilizados, de forma que se pudiera trazar una línea imaginaria entre las tres bacterias formando un triángulo rectángulo. Los hongos utilizados fueron clasificados en los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Metapochonia* y *Trichoderma*. El medio de cultivo empleado fue NA-Mg-G.

MZ0467C fue capaz de inhibir el crecimiento en *Cladosporium*, y más débilmente en *Aspergillus* y *Metapochonia*. No inhibió el crecimiento de

Penicillium y *Trichoderma*. MZ0337C2 y MZ0348B no fueron capaces de inhibir el crecimiento de ninguna de las cepas de hongos ensayadas.

Tabla 7.4. Capacidad de MZ0467C para inhibir el crecimiento de hongos identificados en capítulo 4.

Cepas de hongos	Inhibición del crecimiento
<i>Penicillium</i> (MZ038FG)	-
<i>Cladosporium</i> (MZ039FG)	+
<i>Aspergillus</i> (MZ0315FG)	(+)
<i>Metapochonia</i> (MZ0318FG)	(+)
<i>Trichoderma</i> (MZ0322FG)	-

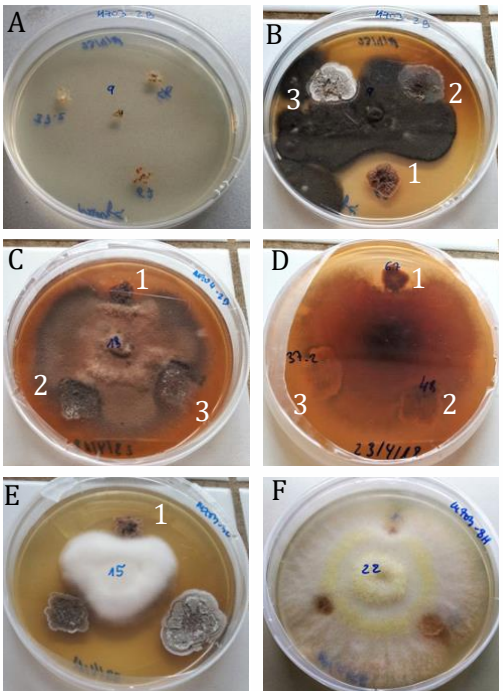


Figura 7.7. Capacidad para inhibir el crecimiento de hongos por parte de las cepas MZ0467C, MZ0337C2 y MZ0348B. (A): Ensayo con *Cladosporium* pasadas 24 horas. (B): Ensayo con *Cladosporium* 28 días después, positivo para MZ0467C (1), negativos MZ0348B (2) y MZ0337C2 (3); (C – D): Frontal y reverso del ensayo con *Aspergillus* pasados 28 días, positivo para MZ0467C (1), negativos MZ0337C2 (3) y MZ0348B (2); (E): Ensayo con *Metapochonia* pasados 28 días, positivo para MZ0467C (1); (F): Ensayo con *Trichoderma* pasados cinco días, negativo para MZ0467C, MZ0337C2 y MZ0348B.

7.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR PARTE DEL RESTO DE *STREPTOMYCES* AISLADOS EN LOS TUBOS DE LAVA

7.2.1 ENSAYOS SOBRE OTROS *STREPTOMYCES* AISLADOS: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Paralelamente al estudio de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos por parte de las cepas de *Streptomyces* susceptibles de describirse como nueva especie, se extrapolaron las metodologías implementadas en los apartados 7.1.1.2 y 7.1.2 con la intención de observar la difusión de agentes antimicrobianos por parte del resto de bacterias identificadas como *Streptomyces* aisladas en la presente tesis doctoral (Tabla 7.5 y Fig. 7.8).

De las 20 cepas identificadas como *Streptomyces* aisladas, siete presentaron actividad antibiótica ante al menos una bacteria utilizada para tal efecto. De ellas, solo MZ0467C y MZ031280H presentaron capacidad para inhibir el crecimiento de todas las bacterias ensayadas. MZ031280H fue parcialmente clasificada en el género *Streptomyces*, compartiendo similitud con tres especies: *S. yatensis*, *S. sporoclivatus* y *S. antimycoticus*. La bibliografía relacionada con estas especies es escasa, existiendo referencias de actividades antibióticas en bacterias Gram positivas y Gram negativas en el caso de *S. yatensis*, mientras que estudios sobre *S. antimycoticus* determinaron su capacidad de inhibición de crecimiento en bacterias Gram positivas (Motohashi y col., 2008; Koch y Löffler, 2009; Sripreechasak, 2014)

Tabla 7.5. Resultados del ensayo para medir la capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano por parte de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* identificadas en el Capítulo 4. Entre paréntesis (): Inhibición débil del microorganismo.

Cepas <i>Streptomyces</i> (Capítulo 4)	Inhibición
MZ0467C	<i>Microbacterium</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> y <i>Sphingomonas</i>
MZ0468C	-
MZ0427C4	-
MZ0421C	-
MZ0376F	<i>Microbacterium</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> y <i>Kocuria</i>
MZ0348B	-

Cepas <i>Streptomyces</i> (Capítulo 4)	Inhibición
MZ0337C2	-
MZ0385C	-
MZ0353C	-
MZ0341C3	(<i>Microbacterium</i>) y (<i>Pseudarthrobacter</i>)
MZ031480H	-
MZ03980H3	(<i>Pseudarthrobacter</i>)
MZ031280H	<i>Microbacterium</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> y <i>Sphingomonas</i>
MZ031180H	-
MZ2640K	<i>Microbacterium</i> , <i>Pseudarthrobacter</i> y <i>Kocuria</i>
MZ2639K	-
MZ2637K	<i>Microbacterium</i> y <i>Pseudarthrobacter</i>
MZ2634K	-
MZ2635K	-
MZ2638K	-

El halo producido por MZ031280H fue especialmente grande ante *Pseudarthrobacter*, siendo más reducido en el caso de *Sphingomonas* (Fig. 7.8 D y 7.8 G, respectivamente).

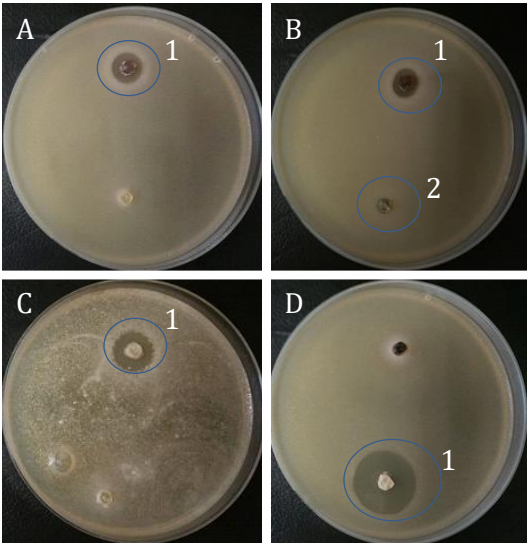


Figura 7.8. Resultados del ensayo para medir la viabilidad de los antimicrobiales producidos por el resto de *Streptomyces*. (A1): MZ0467C, positivo ante *Microbacterium*; (B1): MZ0467C, positivo ante *Pseudarthrobacter*. (B2): MZ0341C3, positivo ante *Pseudarthrobacter*; (C1): MZ0376F, positivo ante *Pseudarthrobacter*; (D1): MZ031280H, positivo ante *Pseudarthrobacter*.

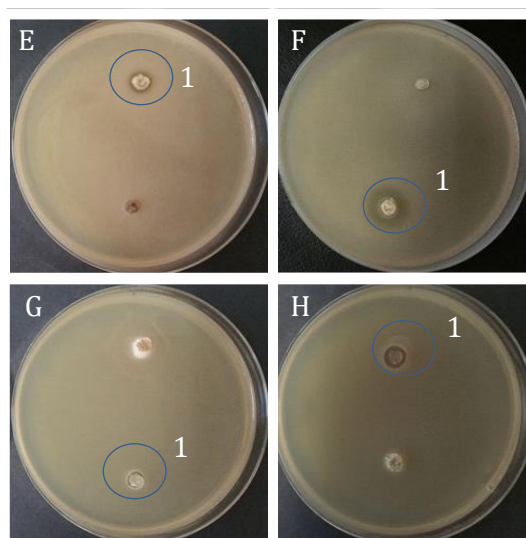


Figura 7.8. (Continuación) (E1): MZ2637K, positivo ante *Microbacterium*; (F1): MZ2640K, positivo ante *Pseudarthrobacter*; (G1): MZ031280H, positivo ante *Sphingomonas*; (H1): MZ0467C, positivo ante *Sphingomonas*.

7.2.2 ENSAYOS SOBRE OTROS *STREPTOMYCES* AISLADOS: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se replicó el ensayo diseñado para observar la capacidad de producir antifúngicos por parte de las cepas susceptibles de describirse como nuevas especies para, en este caso, ampliarlo al resto de cepas aisladas de la presente tesis doctoral identificadas como *Streptomyces*. En esta ocasión se sembraron cuatro cepas bacterianas en la placa donde se inculó cada hongo, tres bacterias aisladas del resto de *Streptomyces* identificados en esta tesis doctoral más MZ0467C.

Al contrario que en el ensayo realizado para comprobar la capacidad de los *Streptomyces* para inhibir el crecimiento de otras bacterias, en esta aproximación se identificaron menos especímenes capaces de inhibir el crecimiento de hongos (Tabla 7.6). Sin embargo, se amplió el espectro de acción en algunas bacterias incluyendo a *Penicillium* como hongo afectado por la producción de antimicrobianos. Ninguna bacteria fue capaz de inhibir el crecimiento de *Trichoderma*.

Tabla 7.6. Resultados del ensayo para medir la capacidad para inhibir el crecimiento de hongos por parte de las cepas bacterianas del género *Streptomyces* identificadas en el capítulo 4. Entre paréntesis se identifica la ID de la cepa aislada.

<i>Streptomyces</i>	Inhibición
MZ0467C	<i>Cladosporium</i> (MZ039FG), <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG), <i>Metapochonia</i> (MZ0318FG)
MZ0468C	-
MZ0427C4	-
MZ0421C	-
MZ0376F	-
MZ0348B	-
MZ0337C2	-
MZ0385C	-
MZ0353C	<i>Penicillium</i> (MZ038FG), <i>Cladosporium</i> (MZ039FG) y <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG)
MZ0341C3	<i>Penicillium</i> (MZ038FG), <i>Cladosporium</i> (MZ039FG) y <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG)
MZ031480H	<i>Cladosporium</i> (MZ039FG) y <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG)
MZ03980H3	(<i>Penicillium</i> (MZ038FG)), <i>Cladosporium</i> (MZ039FG) y <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG)
MZ031280H	<i>Penicillium</i> (MZ038FG), <i>Cladosporium</i> (MZ039FG), <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG) y <i>Metapochonia</i> (MZ0318FG)
MZ031180H	<i>Cladosporium</i> (MZ039FG) y <i>Aspergillus</i> (MZ0315FG)
MZ2640K	-
MZ2639K	-
MZ2637K	-
MZ2634K	-
MZ2635K	-
MZ2638K	-

Cabría destacar a MZ031280H por encima del resto de bacterias ensayadas debido al amplio espectro de acción antifúngica y el amplio margen entre la biomasa de la bacteria y los hongos afectados por su interacción, con respecto a MZ0467C y otros *Streptomyces* (Fig. 7.9)

Estas aproximaciones podrían servir de posible enlace a futuros estudios sobre microorganismos cuyo metabolismo secundario pudiera estar desarrollado de forma que se determinara el interés biotecnológico de las comunidades de *Streptomyces* presentes en los tubos de lava de la isla de La Palma. Para ello, serán necesarios estudios comparativos entre las bacterias aisladas en la presente tesis y las distintas cepas de las diferentes especies que se hayan podido estudiar anteriormente.

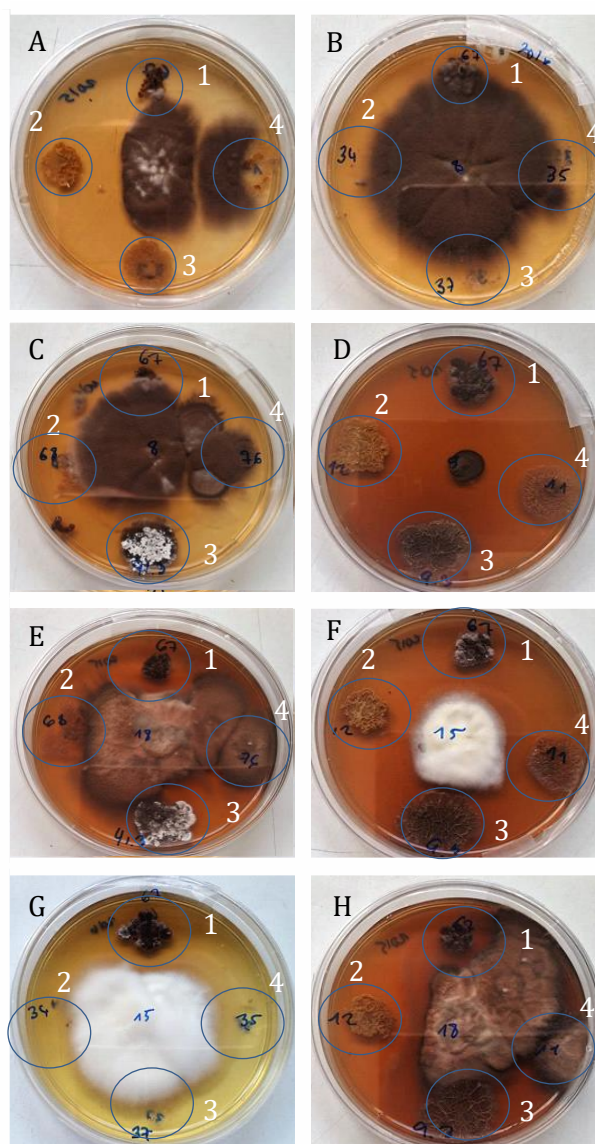


Figura 7.9. Inhibiciones tras 28 días del ensayo realizado para medir la capacidad antifúngica del resto de cepas de *Streptomyces*. **(A. *Penicillium*):** negativo para MZ0467C (1), positivo para MZ031280H (2), debilmente positivo para MZ03980H3 (3), negativo para MZ031180H (4); **(B. *Penicillium*):** negativo para MZ0467C (1), MZ2634K (2), MZ2637K (3) y MZ2635K (4). **(C. *Penicillium*):** negativo para MZ0467C (1), MZ0468C (2) y MZ0376F (4), positivo para MZ0341C3 (2). **(D. *Cladosporium*):** positivo para MZ0467C (1), MZ031280H (2), MZ03980H3 (3) y MZ031180H (4). **(E. *Metapochonia*):**, positivo para MZ0467C (1) y negativo para MZ0468C (2), MZ0341C3 (3) y MZ0376F (4). **(F. *Metapochonia*):** positivo para MZ0467C (1), MZ031280H (2), MZ03980H3 (3) y MZ031180H (4). **(G. *Aspergillus*):** positivo para MZ0467C y negativo para MZ2634K (2), MZ2637K (3) y MZ2635K (4). **(H. *Metapochonia*):** positivos para MZ0467C (1) y MZ031280H (2), negativos para MZ03980H3 (3) y MZ031180H (4).

Conclusions

The following conclusions were extracted from microbiological lava tubes studies:

1. The investigations on the lava tubes from La Palma (Canary Islands) resulted in a high diversity in the *Bacteria* kingdom, but a lower diversity for *Archaea* and *Fungi*. The implementation of cultured-based and non-cultured based methodologies offered a different perspective on the microbial diversity in such a way that both approaches provided complementary tools to give a view as close to reality as possible.
2. As far as non-cultured based methodologies are concerned, Next Generation Sequencing (NGS) libraries offered a detailed view of microbial communities whereas cloning libraries achieved a deeper identification at low taxonomic level. Significant differences were observed between RNA-based and DNA-based analyses carried out for cloning libraries, which could be useful to interpret communities' interactions. Limitations in non-cultured methodologies were partially solved by cultured-based complementary analysis thanks to the identification of microorganisms which present more difficult to be analyzed by non-cultured approaches. Current microbial diversity studies tend to replace cloning libraries by NGS approaches since information is good enough to get a complete overview of the environmental biodiversity. In this sense, comparison of DNA and RNA-based analyses should be a better approximation for the studies.
3. Interpretation of results places the actinobacteria groups in a relevant role for biogeochemical processes in lava tubes. *Euzebyales* and *Pseudonocardiales* were the main groups at order level in coralloids and moonmilk, characteristic speleothems from the studied lava tubes. Isolated strains from the genus *Streptomyces* were abundant, and permitted the description of two new species affiliated to this taxonomic group, *Streptomyces ticalatensis* and *Streptomyces benahoarensis*. Besides, the abundance of *Proteobacteria* and the identification of groups affiliated to this phylum could offer an explanation about the importance of microorganisms in global nutrient cycle flows.

4. Implementation of NGS methodologies have supposed a step forward for the *in silico* study of microorganisms in lava tubes studied. Since the point of view of taxonomic identification, comparison of the whole genome sequence has been presented as the best approach for describing new species of bacteria. Study of RNAr gen 16S is a good approximation for prokaryotes identification but present some limitations that precludes the erection of new species. The best example occurred with the strain MZ0467C that was closely related to *Streptomyces aureus* based on a 16S rRNA gene sequence similarity of 99.78%. This fact initially would reject the description of the strain MZ0467C as new species, but phenotypic and genetic data suggested the need to use whole genome sequencing, which lead to corroborate that strain MZ0467C was a new species of bacteria.
5. Functional study of bacterial whole genome offers a reliable perspective for the prediction of genes involved in the synthesis of secondary metabolites. Bioinformatic tools available to these propositions contribute to a better understanding of biological process carried out by cells. They are useful to analyze the potential resistome mechanisms which are intrinsically presented in the genomes of environmental bacteria. Thus, the existence of genes implicated in conferring resistance to cell towards macrolides and lactams antibiotics were common in sequenced bacteria as well as the presence of polyketides enzymes and non-ribosomal synthases involved in antimicrobials synthesis.
6. *In vitro* assays reinforced the predicted ability for antimicrobial production in strain MZ0467C, but not in the strains MZ0337C2 and MZ0348B. Therefore, a deeper study of genomic data would be necessary to develop more accurate assays to corroborate the potential secondary metabolism in both species.

Referencias

- Abnizova, I., te Boekhorst, R., Orlov, Y. (2017). Computational errors and biases in short read Next Generation Sequencing. *J Proteomics Bioinform* **10**, 1-17.
- Abriouel, H., Franz, C., Ben Omar, N., Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 201-232.
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* **186**, 2629-2635.
- Ackerman, G.G. (2006). Biogeochemical gradients and energetics in geothermal systems of Yellowstone National Park. Department of Land Resources and Environmental Science. Bozeman, MT, USA: Montana State University. Máster Tesis.
- Agersø, Y., Bjerre, K., Brockmann, E., Johansen, E., Nielsen, B., Siezen, R., Stuer-Lauridsen, B., Wels, M., Zeidan, A.A. (2019). Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. *PloS One*. **14**, e0210363.
- Aharonowitz, Y., Av-Gay, Y., Schreiber, R., Cohen, G. (1993). Characterization of a broad-range disulfide reductase from *Streptomyces clavuligerus* and its possible role in beta-lactam antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol* **175**, 623-629.
- Ahlert, J., Distler, J., Mansouri, K., Piepersberg, W. (1997). Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine: Scyllo-inosose aminotransferase from streptomycin-producing Streptomyces. *Arch Microbiol* **168**, 102-113.
- Aird, D., Ross, M.G., Chen, W.S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D.B., Nusbaum, C., Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol* **12**, R18.
- Al-Awadhi, H., Dashti, N., Khanafer, M., Al-Mailem, D., Ali, N., Radwan, S. (2013). Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. *SpringerPlus* **2**, 369.

- Albertano, P., Urzì, C. (1999). Structural interactions among epilithic cyanobacteria and heterotrophic microorganisms in roman hypogea. *Microb Ecol* **38**, 244.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M.J., Abadias, M. (2013). Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. *Food Microbiol* **34**, 390-399.
- Alvarez-Alvarez, R., Botas, A., Albillos, S.M., Rumbero, A., Martín, J.F., Liras, P. (2015). Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microb Cell Fact* **14**, 178.
- Alves, A., Riesco, R., Correia, A., Trujillo, M.E. (2015). *Microbacterium proteolyticum* sp. nov. isolated from roots of *Halimione portulacoides*. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 1794-1798.
- Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321-331.
- Anderson, G.R. (1955). Nitrogen fixation by *Pseudomonas*-like soil bacteria. *J. Bacteriol* **70**, 129-133.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. (2011). Chapter sixteen - Biomethanation and its potential. En: Rosenzweig, A.C., Ragsdale, S.W. (Eds.) *Methods in Enzymology*, Academic Press, 494, 327-351.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R. (2018). Ectomycorrhizal fungal communities in high mountain conifer forests in central Mexico and their potential use in the assisted migration of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza* **28**, 509-521.
- Arrowsmith, T.J., Malpartida, F., Sherman, D.H., Birch, A., Hopwood, D.A., Robinson, J.A. (1992). Characterisation of actI-homologous DNA encoding polyketide synthase genes from the monensin producer *Streptomyces cinnamonensis*. *Mol Gen Genet* **234**, 254-264.
- Ashton, P.M., Nair, S., Dallman, T., Rubino, S., Rabsch, W., Mwaigwisya, S. (2015). MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat Biotechnol* **33**, 296-300.

- Aubrecht, R., Brewer-Carías, Ch., Smída, B., Audy, M., Kovácik, L. (2008). Anatomy of biologically mediated opal speleothems in the World's largest sandstone cave: Cueva Charles Brewer, Chimantá Plateau, Venezuela. *Sediment Geol* **203**, 181-195.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidmann, J.G., Struhl, K. (Eds.) (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York.
- Axenov-Gribanov, D.V., Voytsekhovskaya, I.V., Tokovenko, B.T., Protasov, E.S., Gamaiunov, S.V., Rebets, Y.V., Luzhetsky, A.N., Timofeyev, M.A. (2016). Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk speleothem from the biggest conglomeratic karstic cave in siberia as sources of novel biologically active compounds. *PLoS One* **11**, e0149216.
- Baas-Becking, L.G.M. (1934). *Geologie of Inleiding Tot de Milieukunde*. The Hague: Stockum and Zoon.
- Bai, L., Li, L., Xu, H., Minagawa, K., Yu, Y., Zhang, Y., Zhou, X., Floss, H.G., Mahmud, T., Deng, Z. (2006). Functional analysis of the validamycin biosynthetic gene cluster and engineered production of validoxylamine A. *Chem Biol* **13**, 387-397.
- Baird, A.K., Mohrig, D.C., Welday, E.E. (1985). Vapor deposition in basaltic stalactites, Kilauea, Hawaii. *Lithos* **18**, 151-160.
- Balazs, D. (1975). Lava tubes of the Galapagos Islands. *Nat Speleol Soc Bull* **37**, 1-4.
- Banks, E.D., Taylor, N.M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizzo, J.G., Bullen, H.A., Hoehler, T.M., Barton, H.A. (2010). Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: A function of calcium homeostasis. *Geomicrobiol J* **27**, 444-454.
- Bar-Or, I., Ben-Dov, E., Kushmaro, A., Eckert, W., Sivan, O. (2015). Methane-related changes in prokaryotes along geochemical profiles in sediments of Lake Kinneret (Israel). *Biogeosciences* **12**, 2847-2860.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 1-43.

- Barry, C., Nayar, P., Begley, T. (1989). Phenoxazinone synthase: Mechanism for the formation of the phenoxazinone chromophore of actinomycin. *Biochemistry* **28**, 6323-6333.
- Bartlett, J.M.S., Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* **226**, 3-6.
- Barton, H.A. (2006). Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *J Caves Karst Stud* **68**, 43-54.
- Barton, H.A., Jurado, V. (2007). What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe* **2**, 132-138.
- Barton, H.A., Northup, D.E. (2007). Geomicrobiology in cave environments: past current and future perspectives. *J Cave Karst Stud* **69**, 163-178.
- Barton, H.A., Taylor, N.M., Kreate, M.P., Springer, A.C., Oehrle, S.A., Bertog, J.L. (2007). The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *Int J Speleol* **36**, 93-104.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire, L., McKenzie, J.L. (2006). Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Curr Sci* **90**, 58-64.
- Baskar, S., Baskar, R., Routh, J. (2011). Biogenic evidences of moonmilk deposition in the Mawmluh Cave, Meghalaya, India. *Geomicrobiol J* **28**, 252-265.
- Baskar, S., Routh, J., Baskar, R., Kumar, A., Miettinen, H., Itävaara, M. (2016). Evidences for microbial precipitation of calcite in speleothems from Krem Syndai in Jaintia hills, Meghalaya, India. *Geomicrobiol J* **33**, 906-933.
- Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2009). The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *J Appl Microbiol* **106**, 1456-1462.
- Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2010). The microbiology of the Lascaux Cave. *Microbiology* **156**, 644-652.
- Bäuerlein, E. (2004). Biomineralization: Progress in biology, molecular biology and application. Wiley-VHC Verlag, Weinheim.

- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. (2003). Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Rev Mineral Geochem* **54**, 95-114.
- Bazylinski, D.A., Morillo, V., Lefevre, C.T., Vilorio, N., Dubbels, B.L., Williams, T.J. (2017). *Endothiovibrio diazotrophicus* gen. nov., sp. nov., a novel nitrogen-fixing, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium isolated from a salt marsh. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**, 1492-1498.
- Beech, F.W., Carr, J.G. (1955). A survey of inhibitory compounds for the separation of yeasts and bacteria in apple juices and ciders. *J Gen Microbiol* **13**, 408-410.
- Behrmann, I., Hillemann, D., Pühler, A., Strauch, E., Wohlleben, W. (1990). Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (glnII) encoding a glutamine synthetase similar to those of eucaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricyl-alanyl-alanine. *J Bacteriol* **172**, 5326-5334.
- Bellão, C., Antonio, T., Araujo, M.L.G.C., Badino, A.C. (2013). Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. *Braz J Chem Eng* **30**, 257-266.
- Benita, Y., Oosting, R.S., Lok, M.C., Wise, M.J., Humphery-Smith, I. (2003). Regionalized GC content of template DNA as a predictor of PCR success. *Nucleic Acids Res* **31**, e99.
- Bentley, D.R. y col. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53-59.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites: A personal view. *J Antibiot* **58**, 1-26.
- Bergh S., Uhlen M. (1992). Analysis of a polyketide synthesis-encoding gene cluster of *Streptomyces curacoi*. *Gene* **117**, 131-136.
- Bernard, P., Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E.M., Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* **148**, 71-74.

- Berthelot, C., Leyval, C., Foulon, J., Chalot, M., Blaudez, D., Sessitsch, A. (2016). Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiol Ecol* **92**, Fiw144.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A., Wright, G.D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* **7**, e34953.
- Bibb, M. (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142**, 1335-1344.
- Bienhold, C., Zinger, L., Boetius, A., Ramette, A. (2016). Diversity and biogeography of bathyal and abyssal seafloor bacteria. *PLoS One* **11**, e0148016.
- Birch, A., Leiser, A., Robinson, J.A. (1993). Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding methylmalonyl-coenzyme A mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *J Bacteriol* **175**, 3511-3519.
- Bisen, P.S., Debnath, M., Prasad, G.B. (2012). Identification and classification of microbes. En: Bisen, P.S., Debnath, M., Prasad, G.B. (Eds.) *Microbes*, 275-338.
- Bizjak-Mali, L., Zalar, P., Turk, M., Novak Babič, M., Kostanjšek, R., Gunde-Cimerman, N. (2018). Opportunistic fungal pathogens isolated from a captive individual of the European blind cave salamander *Proteus*. *Dis Aquat Organ* **129**, 15-30.
- Blin, K., Kim, H.U., Medema, M.H., Weber, T. (2017a). Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Brief Bioinform*.
- Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M.G., y col. (2017b). antiSMASH 4.0 - improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res* **45**, 36-41.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H., Prinsep, M.R. (2015). Marine natural products. *Nat Prod Rep* **32**, 116-211.

- Boing, J. (1958). Examination of *Streptomyces mirabilis*. 1. Morphological variations. | Untersuchungen über *Streptomyces mirabilis* ruschmann. 1. Die morphologische variabilität. *Die Pharmazie* **13**, 229-236.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, 170.
- Boston, P.J., Spilde, M.N., Northup, D.E., Melim, L.A., Soroka, D.S., Kleina, L.G., Lavoie, K.H., Hose, L.D., Mallory, L.M., Dahm, C.N., Crossey, L.J., Schelble, R.T. (2001). Cave Biosignature Suites: Microbes, Minerals, and Mars. *Astrobiology* **1**, 25-55.
- Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H. y col. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* **26**, 1146-1153.
- Breazeale, S., Ribeiro, A., Raetz, C. (2003). Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-l-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 24731-24739.
- Bredholdt, H., Galatenko, O.A., Engelhardt, K., Fjærvik, E., Terekhova, L.P., Zotchev, S.B. (2007). Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol* **9**, 2756-2764.
- Britton, G. (1998). Overview of carotenoid biosynthesis. En: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.) Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. Birkhäuser, Basel, 13-147.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2008). Mesophilic *Crenarchaeota*: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat Rev Microbiol* **6**, 245-252.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., Siezen, R.J. (2009). Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microb Biotechnol* **2**, 587-594.
- Brovedan, M., Marchiaro, P., Morán-Barrio, J., Revale, S., Cameranesi, M., Brambilla, L., Viale, A.M., Limansky, A. (2016). Draft genome sequence of *Acinetobacter bereziniae* HPC229, a carbapenem-resistant clinical strain from Argentina harboring bla NDM-1. *Genome Announc* **4**.

- Buermans, H.P.J., den, Dunnen J.T. (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim Biophys Acta* **1842**, 1932-1941.
- Bunet, R., Brock, A., Rexer, H.U., Takano, E. (2006). Identification of genes involved in siderophore transport in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett* **262**, 57-64.
- Burford, E., Kierans, M., Gadd, G. (2003). Geomycology: Fungi in mineral substrata. *Mycologist* **17**, 98-107.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., y col. (1979). Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* **15**, 361-367.
- Burian, J., Ramón-García, S., Sweet, G., Gómez-Velasco, A., Av-Gay, Y., Thompson, C.J. (2011). The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. *J Biol Chem* **287**, 299-310.
- Busse, H.J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 9-37.
- Büttner, D., Bonas, U. (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 107-133.
- Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., Lepidi, A. (2003). Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiol J* **20**, 85-98.
- Cáceres, N.E., Harris, N.B., Wellehan, J.F., Feng, Z., Kapur, V., Barletta, R.G. (1997). Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **179**, 5046-5055.

- Cai, L., Xiao, H., Huang, S., Li, H., Zhou, G. (2013). Solubilization of magnesium-bearing silicate minerals and the subsequent formation of glushinskite by *Aspergillus niger*. *Geomicrobiol J* **30**, 302-312.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden T.L. (2008). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**,421.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthetases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 319-325.
- Cane, D.E., Walsh, C.T. Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.
- Cánovas, D., Vargas, C., Calderón, M.I., Ventosa, A., Nieto, J.J. (1998). Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol* **21**, 487-497.
- Cao, M.D., Nguyen, S.H., Ganesamoorthy, D., Elliott, A.G., Cooper, M.A., Coin, L.J. (2017). Scaffolding and completing genome assemblies in real-time with nanopore sequencing. *Nat Commun* **8**, 14515.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R. (2010a). Global patterns of 16s rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 4516-4522.
- Caporaso, J. G. Kuczynski, J., Stombaugh, J. y col. (2010b). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**, 335-336.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., y col. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* **6**, 1621-1624.
- Carmichael, M.J., Carmichael, S.K., Santelli, C.M., Strom, A., Bräuer, S.L. (2013). Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee river basin. *Geomicrobiol J* **30**, 779-800.

- Carmichael, S.K., Zorn, B.T., Santelli, C.M., Roble, L.A., Carmichael, M.J., Bräuer, S.L. (2015). Nutrient input influences fungal community composition and size and can stimulate manganese (II) oxidation in caves. *Env Microbiol Rep* **7**, 592-605.
- Casimiro-Soriguer, C.S., Muñoz-Mérida, A., Pérez-Pulido, A.J. (2017). Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *Proteomics* **17**, 12.
- Casjens, S. (1998). The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. *Annu Rev Genet* **32**, 339-377.
- Caumette, P., Imhoff, J.F., Suling, J., Matheron, R. (1997). *Chromatium glycolicum* sp. nov., a moderately halophilic purple sulfur bacterium that uses glycolate as substrate. *Arch Microbiol* **167**, 11-18.
- Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Pérez-Mateos, M., Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringenin: a comparative study. *J Sci Food Agric* **90**, 1238-1244.
- Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S.A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S., Ghelardi E. (2016). Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PloS One* **11**, e0152831.
- Challis, G. L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **6**, 601-611.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist* **11**, 265-270.
- Chao, A., Lee, S.M. (1992). Estimating the number of classes via sample coverage. *J Amer Statist Ass* **87**, 210-217.
- Chao, A., Hwang, W.H., Chen, Y.C., Kuo, C.Y. (2000). Estimating the number of shared species in two communities. *Statist Sinica* **10**, 227-246.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S. (2005). Distribution, colonization and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in rhododendrons of central Himalayan region of India. *Forest Ecol Manag* **207**, 315-324.

- Chee, J. (2019). The potential application of *Cupriavidus necator* as polyhydroxyalkanoates producer and single cell protein: A review on scientific, cultural and religious perspectives. *Appl food biotechnol* **6**, 19-34.
- Cheeptham N., Sadoway T., Rule D., Watson K., Moote P., Soliman L.C., Azad N., Donkor K.K., Horne D. (2013). Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *Int J Speleol* **42**, 35-47.
- Chen, L.X., Hu, M., Huang, L.N., Hua, Z.S., Kuang, J.L., Li, S.J., Shu, W.S. (2014). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *ISME J* **9**, 1579-1592.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., y col. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol* **25**, 1007-1014.
- Chen, Y., Wu, L.Q., Boden. R., Hillebrand, A., Kumaresan, D., Moussard, H., Baciú, M., Lu, Y.H., Murrell, J.C. (2009). Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in movile cave. *ISME J* **3**, 1093–1104.
- Chi, W.J., Lee, S.Y., Lee, J. (2011). Functional analysis of SGR4635-induced enhancement of pigmented antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *J Microbiol* **49**, 828-833.
- Choi, T.E., Liu, Q.M., Yang, J.E., Sun, S., Kim, S.Y., Yi, T.H., Im, W.T. (2010). *Sphingomonas ginsenosidimutans* sp. nov., with ginsenoside converting activity. *J Microbiol* **48**, 760-766.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole, P.W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* **38**, e200.
- Cockell, C.S. (2010). Geomicrobiology beyond Earth: microbe-mineral interactions in space exploration and settlement. *Trends Microbiol* **18**, 308-314.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database

- Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res* **42**, 633-642.
- Collins, F.W.J., O'Connor, P.M., O'Sullivan, O., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P. (2016). Formicin - a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576. *Microbiology* **162**, 1662-1671.
- Coloma, A.G., Reina, M., Diaz, C.E., Fraga, B.M. (2010). Natural product based biopesticides for insect. En: Liu, HW., Mander, L. (Eds.) *Comprehensive Natural Products II. Chemistry and Biology* 3. Elsevier, Oxford, 237-268.
- Connelly, D.P., Copley, J.T.P., Murton, B.J., Stansfield, K., Tyler, P.A., y col. (2012). Hydrothermal vent fields and chemosynthetic biota on the world's deepest seafloor spreading centre. *Nat Commun* **3**, 620.
- Cooke, H.A., Bruner, S.D. (2010). Probing the active site of MIO-dependent aminomutases, key catalysts in the biosynthesis of beta-amino acids incorporated in secondary metabolites. *Biopolymers* **93**, 802-810.
- Cote, C.K., Heffron, J.D., Bozue, J.A., Welkos, S.L. (2015). *Bacillus anthracis* and Other *Bacillus* Species. En: Tang, YW., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J. (Eds.) *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition), Academic Press, 1789-1844.
- Criado, L.M., Martin, J.F., Gil, J.A. (1993). The *pab* gene of *Streptomyces griseus*, encoding p-aminobenzoic acid synthase, is located between genes possibly involved in candicidin biosynthesis. *Gene* **126**, 135-139.
- Crosa, J.H., Walsh, C.T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol* **66**, 223-249.
- Crosby, L.D., Criddle, C.S. (2003). Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* **34**, 790-802.
- Cuezva, S., Cañaveras, J.C., González, R., Lario, J., Luque, L., Sáiz-Jiménez, C., Sánchez-Moral, S., Soler, V. (2003). Origen bacteriano de espeleotemas tipo moonmilk en ambiente karstico (Cueva de Altamira, Cantabria, España). *Estudios Geológicos* **59**, 145-157.

- Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Pašić, L., Jurado, V., Hernandez-Marine, M., Serrano-Ortiz, P., Hermosin, B., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2012). The biogeochemical role of *Actinobacteria* in Altamira Cave, Spain. *FEMS Microbiol Ecol* **81**, 281-290.
- Culver, D.C., Pipan, T. (2009). *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. Oxford University Press, Oxford.
- Cundliffe, E. (1992a). Glycosylation of macrolide antibiotics in extracts of *Streptomyces lividans*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 348-352.
- Cundliffe, Eric. (1992b). Resistance to macrolides and lincosamides in *Streptomyces lividans* and to aminoglycosides in *Micromonospora purpurea*. *Gene* **115**, 75-84.
- Cunningham, D.J., Leber, A. (2018). *Enterobacter*, *Cronobacter*, and *Pantoea* species. En: Long, S., Prober, C., Fischer, M. (Eds.) *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, 824-827.
- Cunningham, K.I., Northup, D.E., Pollastro, R.M., Wright, W.G., LaRock, E.J. (1995). Bacteria, fungi and bioKarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environ Geol* **25**, 2-8.
- Curry, M.D., Boston, P.J., Spilde, M.N., Baichtal, J.F., Campbell, A.R. (2009). Cottonballs, a unique subaqueous moonmilk, and abundant subaerial moonmilk in Cataract Cave, Tongass National Forest, Alaska. *Int. J. Speleol* **38**, 111-128.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**, 457-61.
- Da Silva Junior, W., Falcão, R.M., Sousa-Paula, L.C., Sbaraini, N., Vieira, W., Lima, W.G., Paiva, S., Staats, C., Schrank, A., Benko-Issepon, A.M., Balbino, V., Câmara, M. (2018). Draft genome assembly of *Colletotrichum musae*, the pathogen of banana fruit. *Data Brief* **17**, 256-260.
- Dalitz, C.A., Porsani, M.V., Figel, I.C., Pimentel, I.C., Dalzoto, P.R. (2016). Potential for biocontrol of melanized fungi by actinobacteria isolated from intertidal region of Ilha Do Mel, Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol* **48**, 32-36.

- Das, A., Khosla, C. (2009). Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Acc Chem Res* **42**, 631-639.
- Daza, R., Bustillo, M.A. (2014). Exceptional silica speleothems in a volcanic cave: A unique example of silicification and sub-aquatic opaline stromatolite formation (Terceira, Azores). *Sedimentology* **61**, 2113-2135.
- Daza, R., Miller, A.Z., Sáiz-Jiménez, C., Gázquez, F., Calaforra, J., Forti, P., Rull, F., Medina, J., Sanz Arranz, A., Martinez-Frias, J., Toulkeridis, T. (2016). Insights into speleothems from lava tubes of the galapagos islands (Ecuador): Mineralogy and biogenicity. 7th International Symposium of Vulcan Speleology at Ocean View, Big Island, Hawaii (USA).
- De la Rosa, J.M., Martin-Sanchez, P.M., Sanchez-Cortes, S., Hermosin, B., Knicker, H., Saiz-Jimenez, C. (2017). Structure of melanins from the fungi *Ochroconis lascauxensis* and *Ochroconis anomala* contaminating rock art in the Lascaux Cave. *Sci Rep* **7**, 13441.
- De los Ríos, A., Bustillo, M.A., Ascaso, C., Carvalho, M.R. (2011). Bioconstructions in ochreous speleothems from lava tubes on Terceira Island (Azores). *Sedimentary Geology* **236**, 117-128.
- De Mandal, S., Panda, A.K., Lalnunmawii, E., Bisht, S.S., Kumar, N.S. (2015a). Illumina-based analysis of bacterial community in Khuangcherapuk cave of Mizoram, Northeast India. *Genom Data* **5**, 13-14.
- De Mandal, S., Zothansanga, Panda, A.K., Bisht, S.S., Senthil, Kumar, N. (2015b). First report of bacterial community from a Bat Guano using Illumina next-generation sequencing. *Genom Data* **4**, 99-101.
- De Mandal, S., Chatterjee, R., Kumar, N.S. (2017). Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiol* **17**, 90.
- Dedysh, S.N., Didriksen, A., Danilova, O.V., Belova, S.E., Liebner, S., Svenning, M.M. (2015). *Methylocapsa palsarum* sp. nov., a methanotroph isolated from a subArctic discontinuous permafrost ecosystem. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 3618-3624.
- Denner, E.B., Paukner, S., Kämpfer, P., Moore, E.R., Abraham, W.R., Busse, H.J., Wanner, G., Lubitz, W. (2001). *Sphingomonas pituitosa* sp. nov., an

- exopolysaccharide-producing bacterium that secretes an unusual type of sphingan. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 827-841.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5069-5072.
- Devulder, G., Pérouse de Montclos, M., Flandrois, J.P. (2005). A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 293-302.
- Dhami, N.K., Mukherjee, A., Watkin, E.L.J. (2018). Microbial diversity and mineralogical-mechanical properties of calcitic cave speleothems in natural and in vitro biomineralization conditions. *Front Microbiol* **9**, 40.
- Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez, C. (2013). The actinobacterial colonization of Etruscan paintings. *Sci Rep* **3**, 1440.
- Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez, C. (2014). Deterioration of an Etruscan tomb by bacteria from the order *Rhizobiales*. *Sci Rep* **4**, 3610.
- Dia-Herraiz, M. (2015). Caracterización de comunidades microbianas en tumbas etruscas y romanas. Universidad de Sevilla.Tesis.
- diCenzo, G. C., Debiec, K., Krzysztoforski, J., Uhrynowski, W., y col. (2018). Genomic and biotechnological characterization of the heavy-metal resistant, arsenic-oxidizing bacterium *Ensifer* sp. M14. *Genes (Basel)* **9**, 379.
- Ding, C.Q., Li, K.R., Duan, Y.X., Jia, S.R., Lv, H.X., Bai, H., Zhong, C. (2017). Study on community structure of microbial consortium for the degradation of viscose fiber wastewater. *Bioresour Bioprocess* **4**, 31.
- Dinos, G.P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol* **174**, 2967-2983.
- Dischinger, J., Basi Chipalu, S., Bierbaum, G. (2014). Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *Int J Med Microbiol* **304**, 51-62.

- Dittrich, W., Betzler, M., Schrempf, H. (1991). An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein. *Mol Microbiol* **5**, 2789-2797.
- Docampo, S., Trigo, M.M., Recio, M., Melgar, M., García-Sánchez, J., Calderón-Ezquerro, M.C., Cabezudo, B. (2010). High incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* spores in the atmosphere of the cave of Nerja (Malaga, southern Spain). *Aerobiologia* **26**, 89-98.
- Dominguez-Monino, I. (2015). Evaluación y control de comunidades microbianas en cuevas turísticas. Universidad de Sevilla, Tesis.
- Dominguez-Moñino, I., Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Laiz, L., Miller, A.Z., Santos, J.L., Alonso, E., Saiz-Jimenez, C. (2017). Nature and origin of the violet stains on the walls of a Roman tomb. *Sci Total Environ* **598**, 889-899.
- Donachie, S.P., Foster, J.S., Brown, M.V. (2007). Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISMEJ* **1**, 97-102.
- Dong, X.S., Wang, Z.H., Huang, X.R., Jiang, X.J. (2017). Recent discovery in nitrification: One-step nitrification and complete ammonia oxidizing microorganisms. *Chin J Appl Ecol* **28**, 345-352.
- Drlica, K., Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 377-392.
- Drobniowski, F.A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* **6**, 324-338.
- Duan, Y., Wu, Fasi, Wang, Wanfu, He, Dongpeng, Gu, Ji-Dong, Feng, Huyuan, Chen, T., Liu, G., An, L. (2017). The microbial community characteristics of ancient painted sculptures in Maijishan Grottoes, China. *PloS One* **12**, e0179718.
- Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y. (2009). *Pseudonocardia acaciae* sp. nov., isolated from roots of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1487-1491.
- Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., Usami, R. (2005). Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from

- non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems* **1**, 8.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics* **26**, 2460-2461.
- Edouard, S., Fournier, P., Beye, M., Gouriet, F., Dubourg, G., Delerce, J., Swiader, L. Raoult, D. (2018). *Kocuria massiliensis* sp. nov, a new bacterial species isolated from a patient with foot osteomyelitis. *Infection* **46**, 259-262.
- Ehrlich, H.L. (1998). Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Sci Rev* **45**, 45-60.
- Eklom, R., Wolf, J.B. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol Appl* **7**, 1026-1042.
- El-Banna, N.M. (2005). Effect of carbon source on the antimicrobial activity of the air flora. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 1451-1454.
- Elkins, J.M., Clifton, I.J., Hernández, H., Doan, L.X., Robinson, C.V., Schofield, C.J., Hewitson, K.S. (2002). Oligomeric structure of proclavaminc acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. *Biochem J* **366**, 423-434.
- Engel, A.S. (Ed.) (2015). Microbial Life of Cave Systems. Berlin, Walter de Gruyter GmbH, 335 pp.
- Engel, A.S., Porter, M.L., Kinkle, B.K. (2001). Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. *Geomicrobiol J* **18**, 259-274.
- Espino del Castillo, A., Beraldi-Campesi, H., Amador-Lemus, P., Beltrán, H.I., Le Borgne S. (2018). Bacterial diversity associated with mineral substrates and hot springs from caves and tunnels of the Naica Underground System (Chihuahua, Mexico). *Int J Speleol* **47**, 213-227.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., y col. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**, 543-548.
- Evangeline, S., Sridharan T.B. (2018). Screening and optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus drentensis* VIT-SSR3

- isolated from industrial effluent contaminated soil. *Res J Biotechnol* **13**, 79-84.
- Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.
- Fadrosh, D.W., Ma, B., Gajer, P. Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R.M., Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* **2**, 6.
- Fang, B., Salam, N., Han, M., Jiao, J., Cheng, J., Wei, D., Xiao, M., Li, W. (2017). Insights on the effects of heat pretreatment, pH, and calcium salts on isolation of rare *Actinobacteria* from karstic caves. *Front Microbiol* **8**, 1535.
- Farris J.S. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool* **19**, 83-92.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Fernandez-Cortes, A., Soledad Cuezva, S., Alvarez-Gallego, M., Garcia-Anton, E., Pla, C., Benavente, D., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., Sanchez-Moral, S. (2015). Subterranean atmospheres may act as daily methane sinks. *Nat Commun* **6**, 7003.
- Fischer, S.G., Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *PNAS* **80**, 1579-1583.
- Fisher, R.A. (1912). On an absolute criterion for fitting frequency curves. *Messenger Math* **41**, 155-160.
- Fleming, A., Allison, V.D. (1922). Further observations on a bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Lond Ser B* **94**, 142-151.
- Fomina, M., Burford, E.P., Hillier, S., Kierans, M., Gadd, G.M. (2010). Rockbuilding fungi. *Geomicrobiol J* **27**, 624-629.
- Fontaneto, D., Hortal, J. (2012). Microbial biogeography: is everything small everywhere? En: Ogilvie, L.A., Hirschl, P.R. (Eds.). *Microbial Ecological Theory: Current Perspectives*. Norwich, UK: Horizon Scientific Press, 8798 pp.

- Forsberg, K.J., Patel, S., Gibson, M.K., Lauber, C.L., Knight, R., Fierer, N., Dantas, G. (2014). Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* **509**, 612-6.
- Forti, P. (1994). Cave minerals in volcanic caves. Acta I° Incontro Internacional de Vulcanoespeleologia das Ilhas Atlanticas, Pico, Acores. 1992, 1-98.
- Forti, P. (2000). Mineralogenic mechanisms and cave minerals in the volcanic caves of Mt. Etna (Sicily, Italy). *Mitt. Verband. Dt. Höhlen- u. Karstforscher* **46**, 37-41.
- Forti, P. (2005). Genetic processes of cave minerals in volcanic environments: An overview. *J Caves Karst Stud* **67**, 3-13.
- Fouhy, F., Clooney, A.G., Stanton, C., Claesson, M.J., Cotter, P.D. (2016). 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. *BMC Microbiol* **16**, 123.
- Gabriel, C.R., Northup, D.E. (2013). Microbial ecology: Caves as an extreme habitat. En: Cheeptham, N. (Ed.). Cave Microbiomes: A novel Resource for Drug Discovery. SpringerBriefs in Microbiology, Nueva York, Volume 1, 85-108.
- Gadd, G.M. (2008a). Bacterial and fungal geomicrobiology: a problem with communities? *Geobiol* **6**, 278-284.
- Gadd, G.M. (2008b). Fungi and their role in the biosphere. En: Jorgensen, S.E., Fath, B. (Eds.) Encyclopedia of Ecology. Amsterdam: Elsevier, 1709-1717.
- Gadd, G.M., Rhee, Y.J., Stephenson, K., Wei, Z. (2012). Geomycology: metals, actinides and biominerals. *Environ Microbiol Rep* **4**, 270-96.
- Garcia-Fraile, P., Chudíčková, M., Benada, O., Pikula, J., Kolařík, M. (2015). *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 90-94.
- García, G.M., Márquez, G. MA., Moreno, H.CX. (2016). Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiol Res* **182**, 21-30.

- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **2**, 113-8.
- Ghosh, S., Kuisiene, N., Cheeptham, N. (2017). The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochem Pharmacol* **134**, 18-34.
- Gionco, B., Tavares, E.R., de Oliveira, A.G., y col. (2017). New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: A gene expression analysis. *Front Chem* **5**, 66.
- Giovannoni, S.J. (1991). The polymerase chain reaction. En: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.) *Sequencing and Hybridization Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, New York, NY, 177-201.
- Glaeser, S.P., Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst Appl Microbiol* **38**, 237-245.
- Glenn, T.C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* **11**, 759-769.
- Glöckner, J., Kube, M., Shrestha, P.M., Weber, M., Glöckner, F.O., Reinhardt, R., Liesack, W. (2010). Phylogenetic diversity and metagenomics of candidate division OP3. *Environ Microbiol* **12**, 1218-1229.
- Göker, T., Aşık, R.Z., Yılmaz, M.B., Çelik, İ., Tekiner, A. (2017). *Sphingomonas paucimobilis*: A rare infectious agent found in cerebrospinal fluid. *J Korean Neurosurg Soc* **60**, 481-483.
- Gonzalez-Pimentel, J.L., Miller, A.Z., Jurado, V., Laiz, L., Pereira, M.F.C., Saiz-Jimenez, C. (2018). Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active actinobacteria. *Sci Rep* **8**, 1944.
- González, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2005). Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *Int Microbiol* **8**, 189-194.
- Gonzalez, J.M., Portillo, M.C., Saiz-Jimenez, C. (2006). Metabolically active *Crenarchaeota* in Altamira Cave. *Naturwissenschaften* **93**, 42-45.

- Goodfellow, M., Fiedler, HP. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek* **98**, 119.
- Goodwin, S., McPherson, J., McCombie, W. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* **17**, 333-351.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.
- Gower, J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* **53**, 325-338.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* **15**, 203.
- Graspeuntner, S., Loeper, N., Künzel, S., Baines, J.F., Rupp, J. (2018). Selection of validated hypervariable regions is crucial in 16S-based microbiota studies of the female genital tract. *Sci Rep* **8**, 9678.
- Green, M.R., Sambrook, J. (Eds.) (2012). Cold Spring Harbor Laboratory Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1936 pp.
- Greenleaf, W.J., Sidow, A. (2014). The future of sequencing: convergence of intelligent design and market Darwinism. *Genome Biol* **15**, 303.
- Greub, G., Kebbi-Beghdadi, C., Bertelli, C., Collyn, F., Riederer, B.M., Yersin, C., Croxatto, A., Raoult, D. (2009). High throughput sequencing and proteomics to identify immunogenic proteins of a new pathogen: The dirty genome approach. *PLoS One* **4**, e8423.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (Eds.) (2000). Genetics and the Organism: Introduction. An Introduction to Genetic Analysis (7th ed.). New York: W. H. Freeman.
- Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C., Saiz- Jimenez, C. (2001). Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiol J* **18**, 241-258.

- Guermazi, S., Daegelen, P., Dauga, C., y col. (2008). Discovery and characterization of a new bacterial candidate division by an anaerobic sludge digester metagenomic approach. *Environ Microbiol* **10**, 2111-2123.
- Guilfoile, P.G., Hutchinson, C.R. (1991). A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8553-8557.
- Guo, J., Rao, Z., Yang, T., Man, Z., Xu, M., Zhang, X. (2014). High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae*. *FEMS Microbiol Lett* **357**, 85-91.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 149-159.
- Gürtler, H., Pedersen, R., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., Wellington, E.M., Pedersen, C., Bock, K. (1994). Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. *J Antibiot* **47**, 434-439.
- Habazettl, J., Allan, M., Jensen, P.R., Sass, H.J., Thompson, C.J., Grzesiek, S. (2014). Structural basis and dynamics of multidrug recognition in a minimal bacterial multidrug resistance system. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E5498-5507.
- Haleyur, N., Shahsavari, E., Taha, M., Khudur, L., Koshlaf, E., Osborn, A., Ball, A. (2018). Assessing the degradation efficacy of native PAH-degrading bacteria from aged, weathered soils in an Australian former gasworks site. *Geoderma* **321**, 110-117.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**, 95-98.
- Hambraeus, G., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L. (2003). Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol Genet Genomics* **269**, 706-714.

- Hamilton, T.L., Jones, D.S., Schaperdoth, I., Macalady, J.L. (2015). Metagenomic insights into S(0) precipitation in a terrestrial subsurface lithoautotrophic ecosystem. *Front Microbiol* **5**, 756.
- Hao, X., Chen, T. (2012). OTU Analysis Using Metagenomic Shotgun Sequencing Data. *PloS One* **7**, e49785.
- Hara, O., Hutchinson, C. (1992). A macrolide 3-O-acyltransferase gene from the midecamycin-producing species *Streptomyces mycarofaciens*. *J Bacteriol* **174**, 5141-5144.
- Harris, J.K., Kelley, S.T., Pace, N.R. (2004). New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* **70**, 845-849.
- Hatayama, K., and Saito, K. (2018). Calcite formation induced by *Ensifer adhaerens*, *Microbacterium testaceum*, *Paeniglutamicibacter kerguelensis*, *Pseudomonas protegens* and *Rheinheimera texasensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **112**, 711-721.
- Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Balasch, M.M., Spilde, M.N., Stone, F.D., Dapkevicius, M.L., Amorim, I.R., Gabriel, R., Borges, P.A., Northup, D.E. (2014). Comparison of bacterial diversity in azorean and hawai'ian lava cave microbial mats. *Geomicrobiol J* **31**, 205-220.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal rna analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* **35**, 1-21.
- Heather, J.M., Chain, B. (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1-8.
- Hemati, A., Aliasgharzad, N., Khakvar, R. (2018). In vitro evaluation of lignocellulolytic activity of thermophilic bacteria isolated from different composts and soils of Iran. *Biocatal Agric Biotechnol* **14**, 424-430.
- Henkels, M.D., Kidarsa, T.A., Shaffer, B.T. (2014). *Pseudomonas protegens* Pf-5 causes discoloration and pitting of mushroom caps due to the production of antifungal metabolites. *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 733-746.

- Hernandez, C., Olano, C., Mendez, C., Salas, J.A. (1993). Characterization of a *Streptomyces antibioticus* gene cluster encoding a glycosyltransferase involved in oleandomycin inactivation. *Gene* **134**, 139-140.
- Hershey, O.S., Barton, H.A. (2018). The microbial diversity of caves. En: Moldovan, O.T., Kováč, L., Halse, S. (Eds.) *Cave Ecology. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)*. Springer, Cham, 69-90.
- Hilario, E., Buckley, T.R., Young, J. M. (2004). Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atpD, carA, recA and 16S rDNA. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**, 51-64.
- Hill, C.A., Forti, P. (1997). *Cave minerals of the World*. National Speleological Society, Huntsville, 464 pp.
- Hobbs, G, Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Flett, F., Oliver, S.G. (1990). Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *J Gen Microbio* **136**, 2291-2296.
- Hofmann, K., Wood, S.W., Brinton, C.C., Montibeller, J.A., Finn, F.M. (1980). Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 4666-4668.
- Höltzel, A., Dieter, A., Schmid, D.G., Brown, R., Goodfellow, M., Beil, W., Jung, G., Fiedler, H.P. (2003). Lactonamycin Z, an antibiotic and antitumor compound produced by *Streptomyces sanglieri* strain AK 623. *J Antibiot (Tokyo)* **56**, 1058-1061.
- Hopwood, D.A. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press, New York, NY.
- Horgan, R., Kenny, L. (2011). ‘Omic’ technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Obstet Gynecol* **13**, 189-195.
- Hortal, J. (2011). Geographical variation in the diversity of microbial communities: Research directions and prospects for experimental biogeography. En: Fontaneto, D. (Ed.) *Biogeography of Microscopic Organisms; Is Everything Small Everywhere?* Cambridge, UK: Systematics Association and Cambridge University Press, 335-358.

- Hose, L.D., Palmer, A.N., Palmer, M.V., Northup, D.E., Boston, P.J., DuChene, H.R. (2000). Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chem Geol* **169**, 399-423.
- Huang, E., Yousef, A.E. (2015). Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by *Paenibacillus polymyxa*. *Microbiol Res* **181**, 15-21.
- Huber, K.J., Wust, P.K., Rohde, M., Overmann, J., Foesel, B.U. (2014). *Aridibacter famidurans* gen. nov., sp. nov. and *Aridibacter kavangonensis* sp. nov., two novel members of subdivision 4 of the *Acidobacteria* isolated from semiarid savannah soil." *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 1866-1875.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A.M., Blackall, L.L. (2001). Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* **67**, 411-419.
- Hunkapiller, T., Kaiser, R., Koop, B., Hood, L. (1991). Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science* **254**, 59-67.
- Hunter, W.J. (2014). *Pseudomonas seleniipraecipitans* proteins potentially involved in selenite reduction. *Curr Microbiol* **69**, 69-74.
- Hyatt, D., Chen, G.L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., Hauser, L.J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**, 119.
- Ichinose, K., Bedford, D.J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M.J., Revill, W.P., Floss, H.G., Hopwood, D.A. (1998). The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chem Biol* **5**, 647-659.
- Ikner, L.A., Toomey, R.S., Nolan, G., Neilson, J.W., Pryor, B.M., Maier, R.M. (2007). Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microb Ecol* **53**, 30.

- Imhoff, J.F. (2016). Natural products from marine fungi--still an underrepresented resource. *Mar Drugs* **14**, 19.
- Inokoshi, J., Takeshima, H., Ikeda, H., Omura, S. (1992). Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from *Actinoplanes utahensis* and expression in *Streptomyces lividans*. *Gene* **119**, 29-35.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-45.
- Ishikawa, J., Hotta, K. (1991). Nucleotide sequence and transcriptional start point of the kan gene encoding an aminoglycoside 3-n-acetyltransferase from *Streptomyces griseus* SS-1198PR. *Gene* **108**, 127-132.
- Itoh, T., Yamanoi, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Takashina, T. (2011). *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1281-1285.
- Jagetia, A., Jagetia, G.C., Jha, S. (2007). Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival. *J Appl Toxicol* **27**, 122-132.
- Jakobi, K., Hertweck, C. (2004). A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*; Exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns. *J Am Chem Soc* **126**, 2298-2299.
- Jamoussi, K., Sellami, S., Nasfi, Z., Krichen-Makni, S., Tounsi, S. (2013). Efficiency and midgut histopathological effect of the newly isolated *Bacillus thuringiensis* KS δ -endotoxins on the emergent pest *Tuta absoluta*. *J Microbiol Biotechnol* **23**, 1099-1106.
- Jinendiran, S., Boopathi, S., Sivakumar, N., Selvakumar, G. (2017). Functional characterization of probiotic potential of novel pigmented bacterial strains for aquaculture applications. *Probiotics Antimicrob Proteins* **11**, 186-197.
- Jobbagy, E.G., Jackson, R.B. (2001). The distribution of soil nutriment with depth: Global patterns of the imprint of plants. *Biogeochemistry* **53**, 51-77.

- Johansson H., Dhaygude, K., Lindström, S., Helanterä, H., Sundström, L., Trontti, K. (2013). A metatranscriptomic approach to the identification of microbiota associated with the ant *Formica exsecta*. *PLoS One* **8**, e79777.
- Joly, D., Faure, D. (2015). Next-generation sequencing propels environmental genomics to the front line of research. *Heredity (Edinb)* **114**, 429-30.
- Jones, D.S., Tobler, D.J., Schaperdoth, I., Mainiero, M., Macalady, J.L. (2010). Community structure of subsurface biofilms in the thermal sulfidic caves of Acquasanta Terme, Italy. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5902-5910.
- Jones, D.S., Albrecht, H.L., Dawson, K.S., Schaperdoth, I., Freeman, K.H., Pi, Y., Pearson, A., Macalady, J.L. (2012). Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *ISME J* **6**, 158-170.
- Jones, D.S., Schaperdoth, I., Macalady, J.L. (2014). Metagenomic evidence for sulfide oxidation in extremely acidic cave biofilms. *Geomicrobiol J* **31**, 194-204.
- Jones, R.T., Robeson, M.S., Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N. (2009). A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. *ISME J* **3**, 442-453.
- Jordá-Bordehore, L., Toulkeridis, T., Romero-Crespo, P.L., Jordá-Bordehore, R., García- Garizabal, I. (2016). Stability assessment of volcanic lava tubes in the Galápagos using engineering rock mass classifications and an empirical approach. *Int J Rock Mech Min* **89**, 55-67.
- Jung, J., Jeong, H., Kim, H.J., Lee, D.W., Lee, S.J. (2016). Complete genome sequence of *Bacillus oceanisediminis* 2691, a reservoir of heavy-metal resistance genes. *Mar Genomic* **30**, 73-76.
- Jurado, V., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2008). Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. *Int Biodeterior Biodegradation* **62**, 325-330.
- Jurado, V., Laiz, L., Rodriguez-Nava, V., Boiron, P., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2010a). Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *Int J Speleol* **39**, 15-24.

- Jurado, V., Porca, E., Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. (2010b). Fungal outbreak in a show cave. *Sci Total Environ* **408**, 3632-3638.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Roser, A., Koops, H.P., Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3042-3051.
- Kadnikov, V., Frank, Y., Mardanov, A., Beletsky, A., Karnachuk, O., Ravin, N. (2017). Metagenome of the siberian underground water reservoir. *Genome Announc* **5**, 47.
- Kadnikov, V., Mardanov, A., Beletsky, A., Banks, D., Pimenov, N., Frank, Y., Karnachuk, O.V., Ravin, N.V. (2018). A metagenomic window into the 2-km-deep terrestrial subsurface aquifer revealed multiple pathways of organic matter decomposition. *FEMS Microbiol Ecol* **94**.
- Kalb, V.F., Bernlohr, R.W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem* **82**, 363-371.
- Kamboj, V.K., Kapoor, A., Jain, S. (2019). Synthesis, antimicrobial, and antioxidant screening of aryl acetic acid incorporated 1,2,4-triazolo-1,3,4-thiadiazole derivatives. *J Heterocycl Chem*.
- Kämpfer P. (2006). The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (Eds.) The Prokaryotes. Springer, New York, NY
- Kampfer, P., Denner, E.B., Meyer, S., Moore, E.R., Busse, H.J. (1997). Classification of "*Pseudomonas azotocolligans*" Anderson 1955, 132, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 577-583.
- Kanagawa T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* **96**, 317-323.
- Kannenbergh, E.L., Perzl, M., Muller, P., Hartner, T., Poralla, K. (1996). Hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* and other plant-associated bacteria and cloning of

- the *Bradyrhizobium japonicum* squalene-hopene cyclase gene. *Plant Soil* **186**, 107-112.
- Kannenbergh, E.L., Poralla, K. (1999). Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**, 168-176.
- Kariminik, A., Baniasadi, F. (2010). Pageantagonistic activity of actinomycetes on some Gram-negative and Gram-positive bacteria. *World Appl Sci J* **8**, 828-832.
- Karnwal, A. Bhardwaj, V., Dohroo, A., Upadhyay, A.K., Bala, R. (2018). Effect of microbial surfactants on heavy metal polluted wastewater. *Pollution Research*, **37**, S39-S46.
- Kaysser, L., Bernhardt, P., Nam, S.J., Loesgen, S., Ruby, J.G., Skewes-Cox, P., Jensen, P.R., Fenical, W., Moore, B.S. (2012). Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases. *J Am Chem Soc* **134**, 11988-11991.
- Kerr, J. (1994). Inhibition of fungal growth by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Infect* **28**, 305-310.
- Khaleghi, M., Khorrami, S., Ravan, H. (2019). Identification of *Bacillus thuringiensis* bacterial strain isolated from the mine soil as a robust agent in the biosynthesis of silver nanoparticles with strong antibacterial and anti-biofilm activities. *Biocatal Agric Biotechnol* **18**, 101047.
- Kharat, K., Kharat, A., Hardikar, B. (2009). Antimicrobial and cytotoxic activity of *Streptomyces* sp. from Lonar Lake. *Afr J Biotechnol* **8**, 6645-6648.
- Khosla, C., Tang, Y., Chen, A., Schnarr, N., Cane, D. (2007). Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide b synthase. *Annu Rev Biochem* **76**, 195-221.
- Kim, I., Lee, M., Wang, S. (2014). Heavy metal removal in groundwater originating from acid mine drainage using dead *Bacillus drentensis* sp. immobilized in polysulfone polymer. *J Environ Manage* **146**, 568-74.

- Kim, J.S., Kim, D.S., Lee, K.C., Lee, J.S., King, G.M., Kang, S., Brusetti, L. (2018). Microbial community structure and functional potential of lava-formed Gotjawal soils in Jeju, Korea. *PloS One* **13**, e0204761.
- Kim, K.Y., Cho, J.H., Yu, C.M., Lee, K.J., Lee, J.M., Koh, S., Kwon, M., Jeong, D. (2018). A Case of Community-acquired Bacteremic Empyema Caused by *Kocuria kristinae*. *Infect Chemother* **50**, 144-148.
- Kim, P.I., Ryu, J., Kim, Y.H., Chi, Y.T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 138-145.
- Kimura, S., Bryan, C., Hallberg, K., Johnson, D. (2011). Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environ Microbiol* **13**, 2092-2104.
- Kirby, J.T., Sader, H.S., Walsh, T.R., Jones, R.N. (2004). Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium spp*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *J Clin Microbiol* **42**, 445-448.
- Kiyuna, T., An, K., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., Sugiyama, J. (2011). Molecular assessment of fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov. *Mycoscience* **52**, 1-17.
- Kling, A., Lukat, P., Almeida, D.V., Bauer, A., y col. (2015). Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins. *Science* **348**, 1106-1112.
- Klusaite, A., Vickackaite, V., Vaitkeviciene, B., Karnickaite, R., Bukelskis, D., Kieraite-Aleksandrova, I., Kuisiene, N. (2016). Characterization of antimicrobial activity of culturable bacteria isolated from Krubera-Voronja Cave. *Int J Speleol* **45**, 275-287.
- Koch, E., Löffler, I. (2009). Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *J Phytopathol* **157**, 235-242.

- Kodani, S., Hudson, M.E., Durrant, M.C., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., Willey, J.M. (2004). The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11448-11453.
- Kojiri, K., Nakajima, S., Suzuki, H., Kondo, H., Suda, H. (1992). A new macrocyclic lactam antibiotic, BE-14106. *J Antibiot* **45**, 868-874
- Konhauser, K.O., Urrutia, M.M. (1999). Bacterial clay authigenesis: a common biogeochemical process. *Chem Geol* **161**, 399-413.
- Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**, 543-546.
- Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 2567-2572.
- Kosanić, M., Ranković, B.R. (2011). Antibacterial and antifungal activity of different lichens extracts and lichen acid. *Res J Biotechnol* **6**, 23-26.
- Kotoucková, L., Schumann, P., Durnová, E., Spröer, C., Sedláček, I., Neca, J., Zdráhal, Z., Nemec, M. (2004). *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 773-777.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* **79**, 5112-5120.
- Krishna, K.R., Philip, L. (2008). Biodegradation of mixed pesticides by mixed pesticide enriched cultures. *J Environ Sci Health B* **44**, 18-30.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W.A., González, A., Caporaso, J.G., Knight, R. (2012). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol* **1**, Unit-1E.5.
- Kuhlmann, A.U., Bremer, E. (2002). Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**, 772-783.

- Kuisiene, N., Raugalas, J., Spröer, C., Kroppenstedt, R.M., Chitavichius, D. (2008). *Bacillus butanolivorans* sp. nov., a species with industrial application for the remediation of n-butanol. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 505-509.
- Kulichevskaya, I.S., Suzina, N.E., Rijpstra, W.I., Sinninghe Damsté, J.S., Dedysh, S.N. (2014). *Paludibaculum fermentans* gen. nov., sp. nov., a facultative anaerobe capable of dissimilatory iron reduction from subdivision 3 of the *Acidobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 2857-2864.
- Kumar, K.S., Sahu, M.K., Kandasamy, K. (2005). Isolation and characterisation of streptomycetes producing antibiotic, from a mangrove environment. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci* **7**, 457-464.
- Kumaresan, D., Stephenson, J., Doxey, A.C., Bandukwala, H., Brooks, E., Hillebrand-Voiculescu, A., Whiteley A.S., Murrell, J.C. (2018). Aerobic proteobacterial methylotrophs in Movile Cave: genomic and metagenomic analyses. *Microbiome* **6**, 1.
- Kumari, H., Gupta, S.K., Jindal, S., Katoch, P., Lal, R. (2009). *Sphingobium lactosutens* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site and *Sphingobium abikonense* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2291-296.
- Kumari, R., Singh, P., Lal, R. (2016). Genetics and genomics of the genus *Amycolatopsis*. *Indian J Microbiol* **56**, 233-246.
- Kurahashi, M., Fukunaga, Y., Sakiyama, Y., Harayama, S., Yokota, A. (2010). *Euzebya tangerina* gen. nov., sp. nov., a deeply branching marine actinobacterium isolated from the sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of *Euzebyaceae* fam. nov., *Euzebyales* ord. nov. and *Nitriliruptoridae* subclassis nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 2314-2319.
- Kuroda, M., Kuwahara-Arai, K., Hiramatsu, K. (2000). Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 485-490.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A.L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., Salzberg, S.L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**, R12.

- La Cono, V., Urzì, C. (2003). Fluorescent in situ hybridization applied on samples taken with adhesive tape strips. *J Microbiol Methods* **55**, 65-71.
- La Scola, B., Elkarkouri, K., Li, W., Wahab, T., Fournous, G., Rolain, J. M., Biswas, S., Drancourt, M., Robert, C., Audic, S., Löfdahl, S., Raoult, D. (2008). Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: The *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res* **18**, 742-750.
- Labeda, D.P. (1995). *Amycolatopsis coloradensis* sp. nov., the avoparcin (LL-AV290)-producing strain. *Int J Syst Evol Microbiol* **45**, 124-127.
- Laiz, L., Gonzalez-Delvalle, M., Hermosin, B., Ortiz-Martinez, A., Saiz-Jimenez, C. (2003). Isolation of cave bacteria and substrate utilization at different temperature. *Geomicrobiol J* **20**, 479-489.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Ed.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York, NY, 115-175.
- Lane, D.J., Pace, B., Olse, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6955-6959.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M.C., Dawyndt, P., Liu, Z., Huang, Y., Swings, J. (2005). Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Res Microbiol* **156**, 755-762.
- Lányi, B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol* **19**, 1-67.
- Laursen, M.F., Dalgaard, M.D., Bahl, M.I. (2017). Genomic GC-content affects the accuracy of 16S rRNA gene sequencing based microbial profiling due to PCR bias. *Front Microbiol* **8**, 1934.
- Lavoie, K.H., Winter, A.S., Read, K.J.H., Hughes, E.M., Spilde, M.N., Northup, D.E. (2017). Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA. *PLoS One* **12**, 1-27.

- Leach, A.L., Chong, J.P., Redeker, K.R. (2012). SSuMMo: rapid analysis, comparison and visualization of microbial communities. *Bioinformatics* **28**, 679-686.
- Lechevalier, M.P., Prauser, H., Labeda, D.P., Ruan, J.S. (1986). Two genera of nocardioform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 29-37.
- Lee, H.J., Whang, K.S. (2016). *Streptomyces rhizosphaerihabitans* sp. nov. and *Streptomyces adustus* sp. nov., isolated from bamboo forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 3573-3578.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.C., Chun, J. (2016). OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 1100-1103.
- Lee, N.M., Meisinger, D.B., Aubrecht, R., Engel, A.S. (2012). Caves and karst environments. En: Bell, E., (Ed.) *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*, CABI, 320-344.
- Leigh M.B., Taylor L., Neufeld J.D. (2010). Clone libraries of ribosomal rna gene sequences for characterization of bacterial and fungal communities. En: Timmis K.N. (Ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 3969-3993.
- Lepinay, C., Mihajlovski, A., Seyer, D., Tournon, S., Bousta, F., Di Martino, P. (2017). Biofilm communities survey at the areas of salt crystallization on the walls of a decorated shelter listed at UNESCO World cultural Heritage. *Int Biodeterior Biodegradation* **122**, 116-127.
- Leroy, F., de Vuyst, L. (1996). The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5350-5356.
- Li, J., Zhao, G.Z., Huang, H.Y., Zhu, W.Y., Lee, J.C., Kim, C.J., Xu, L.H., Zhang, L.X., Li, W.J. (2010). *Pseudonocardia rhizophila* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a rhizosphere soil. *Antonie van Leeuwenhoek* **98**, 77-83.
- Li, L., Olsen, H.R., Ye, L., Yan, H., Nie, Q., Meng, H., Shi, L. (2016). Antimicrobial resistance and resistance genes in aerobic bacteria isolated from pork at slaughter. *J Food Prot* **79**, 589-597.

- Li, R., Tun, H.M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Dilantha Fernando, W.G., Farenhorst, A., Khafipour, E. (2017). Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci Rep* **7**, 5752.
- Li, Y., Dosch, D.C., Strohl, W.R., Floss, H.G. (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the nosiheptide-resistance gene from *Streptomyces actuosus*. *Gene* **91**, 9-17.
- Liang, Y., Chen, L., Ye, X., Anjum, K., Lian, X., Zhang, Z. (2017). New streptophenazines from marine *Streptomyces* sp. 182SMLY. *Nat Prod Res* **31**, 411-417.
- Lin, X., Kennedy, D., Fredrickson, J., Bjornstad, B., Konopka, A. (2012). Vertical stratification of subsurface microbial community composition across geological formations at the Hanford Site. *Environ Microbiol* **14**, 414-425.
- Lippert, K., Galinski, E.A. (1992). Enzyme stabilisation by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 61-65.
- Liu, W., Nonaka, K., Nie, L., Zhang, J., Christenson, S., Bae, J., Van Lanen, S.G., Zazopoulos, E., Farnet, C.M., Yang, C.F., Shen, B. (2005). The neocarzinostatin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces carzinostaticus* ATCC 15944 involving two iterative type I polyketide synthases. *Chem Biol* **12**, 293-302.
- Liu, Y., Whitman, W.B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 171-189.
- Liu, Y., Shi, H., Wang, Z., Huang, X., Zhang, X. (2018). Pleiotropic control of antibiotic biosynthesis, flagellar operon expression, biofilm formation, and carbon source utilization by RpoN in *Pseudomonas protegens* H78." *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 9719-9730.
- Liu, Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res* **36**, e120.
- Lowenstam, H.A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science* **211**, 1126-1131.

- Lowenstam, H.A., Weiner, S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press, Nueva York.
- Lozano, R.P., Rossi, C. (2012). Exceptional preservation of Mn-oxidizing microbes in cave stromatolites (El Soplao, Spain). *Sediment Geol* **255-256**, 42-55.
- Lozupone, C., Knight, R. (2005). UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8228-8235.
- Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **73**, 157685.
- Lu, H., Giordano, F., Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **14**, 265-279.
- Lu, J., Nogi, Y., Takami, H. (2001). *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 291-297.
- Lucas, E.M.F., Machado, Y., Ferreira, A.A., Dolabella, L.M.P., Takahashi, J.A. (2010). Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. *Trop J Pharma Res* **9**,365-71.
- Luna, G.M., Stumm, K., Pusceddu, A., Danovaro, R. (2009). Archaeal diversity in deep-sea sediments estimated by means of different terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) protocols. *Curr Microbiol* **59**, 356-361.
- Macalady, J.L., Lyon, E.H., Koffman, B., Albertson, L.K., Meyer, K., Galdenzi, S., Mariani S. (2006). Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 5596-5609.
- Macalady, J.L., Jones, D.S., Lyon, E.H. (2007). Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environ Microbiol* **9**, 1402-1414.
- Macalady, J.L., Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Jones, D.S., Druschel, G.K., Eastman, D. (2008). Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *ISME J* **2**, 590-601.

- Maciejewska, M., Adam, D., Martinet, L., Naômé, A., Całusińska, M., Delfosse, P., Carnol, M., Barton, H.A., Hayette, M.P., Smargiasso, N., De Pauw, E., Hanikenne, M., Baurain, D., Rigali, S. (2016). A phenotypic and genotypic analysis of the antimicrobial potential of cultivable *Streptomyces* isolated from cave moonmilk deposits. *Front Microbiol* **7**, 1455.
- Maciejewska, M., Adam, D., Naômé, A., Martinet, L., Tenconi, E., Całusińska, M., Delfosse, P., Hanikenne, M., Baurain, D., Compère, P., Carnol, M., Barton, H.A., Rigali, S. (2017). Assessment of the potential role of *Streptomyces* in cave moonmilk formation. *Front Microbiol* **8**, 1181.
- Maciejewska, M., Całusińska, M., Cornet, L., Adam, D., Pessi, I., Malchair, S., Delfosse, P., Baurain, D., Barton, H.A., Carnol, M., Rigali, S. (2018). High-Throughput sequencing analysis of the actinobacterial spatial diversity in moonmilk deposits. *Antibiotics (Basel)* **7**, 27.
- Mahaney, W., Zippin, J., Milner, M., Sanmugadas, K., Hancock, R., Aufreiter, S., Campbell, S., Huffman, M.A., Wink, M., Malloch, D., Kalm, V. (1999). Chemistry, mineralogy and microbiology of termite mound soil eaten by the chimpanzees of the Mahale mountains, western Tanzania. *J Trop Ecol* **15**, 565-588.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russel, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3140-3145.
- Maiden, M.C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria *Annu Rev Microbiol* **60**, 561-588.
- Makkar, N.S., Casida, L.E. (1987). *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov. - a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 323-326.
- Malin, G., Lapidot, A. (1996). Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol* **178**, 385-395.
- Mander, L., Lui, H.W. (2010). Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology. Elsevier: Oxford, 205-236.

- Manfio, G.P., Atalan, E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M., Rodríguez, C., Collins, M.D., Goodfellow, M. (2003). Classification of novel soil streptomycetes as *Streptomyces aureus* sp. nov., *Streptomyces laceyi* sp. nov. and *Streptomyces sanglieri* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**, 245-255.
- Mann, S. (2001). Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. Oxford University Press, Nueva York.
- Mansson, M., Gram, L., Larsen, T.O. (2011). Production of bioactive secondary metabolites by marine vibronaceae. *Mar Drugs* **9**, 1440-1468.
- Manter, D.K., Hunter, W.J., Vivanco, J.M. (2011). *Enterobacter soli* sp. nov.: a lignin-degrading γ -proteobacteria isolated from soil. *Curr Microbiol* **62**, 1044-1049.
- Manzoor, M., Shabeena, K., Mujeeburahiman, M., Khan, A. (2018). Indwelling J ureteral stents associated asymptomatic bacteraemia caused by multidrug resistant strain of *Kocuria kristinae*. *J Clin Diagn Res* **12**, PD15-PD16.
- Mao, Y., Varoglu, M., Sherman, D. (1999). Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol* **6**, 251-263.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W., Attiya, S. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.
- Markande, A.R, Nerurkar, A.S. (2016a). Bioemulsifier (BE-AM1) produced by *Solibacillus silvestris* AM1 is a functional amyloid that modulates bacterial cell-surface properties. *Biofouling* **32**, 1153-1162.
- Markande, A.R, Nerurkar, A.S. (2016b). Microcosm-based interaction studies between members of two ecophysiological groups of bioemulsifier producer and a hydrocarbon degrader from the Indian intertidal zone. *Environ Sci Pollut Res Int* **23**, 14462-14471.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* **3**, 208-218.

- Martin-Sanchez, P.M., Sanchez-Cortes, S., Lopez-Tobar, E., Jurado, V., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2012a). The nature of black stains in Lascaux Cave, France, as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J Raman Spectrosc* **43**, 464-467.
- Martin-Sanchez, P.M., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2012b). Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux Cave, France. *Fungal Biol* **116**, 574-589.
- Martínez-Arkarazo, I., Angulo, M., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Madariaga, J.M. (2007). Spectroscopic characterisation of moonmilk deposits in Pozalagua tourist Cave (Karrantza, Basque Country, North of Spain). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **68**, 1058-1064.
- Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Vargas-Albores, F. (2016). Significant loss of sensitivity and specificity in the taxonomic classification occurs when short 16S rRNA gene sequences are used. *Heliyon* **2**, e00170.
- Mathews, S., Grunden, A., Pawlak, J. (2016). Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus*. *Int Biodeterior Biodegradation* **110**, 79-86.
- Mavrodi, D.V., Ksenzenko, V.N., Bonsall, R.F., Cook, R.J., Boronin, A.M., Thomashow, L.S. (1998). A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol* **180**, 2541-2548.
- Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 560-4.
- Mayanna, S., Peacock, C., Schäffner, F., Grawunder, A., Merten, D., Kothe, E., Büchel, G. (2015). Biogenic precipitation of manganese oxides and enrichment of heavy metals at acidic soil pH. *Chem Geol* **402**, 6-17.
- McCulley, R.L., Jobbágy, E.G., Pockman, W.T., Jackson, R.B. (2004). Nutrient uptake as a contributing explanation for deep rooting in arid and semi-arid ecosystems. *Oecol* **141**, 620-628.
- Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, V.J., y col. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite

- biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **39**, 339-346.
- Mehta, A.P., Torma, A.E., Murr, L.E. (1979). Effect of environmental parameters on the efficiency of biodegradation of basalt rock by fungi. *Biotechnol Bioeng* **21**, 875-85.
- Méndez, A., Pérez, C., Montañéz, J.C., Martínez, G., Aguilar, C.N. (2011). Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *J Zhejiang Univ Sci B* **12**, 961-8.
- Mengoni, A., Tatti, E., Decorosi, F., Viti, C., Bazzicalupo, M., Giovannetti, L. (2005). Comparison of 16S rRNA and 16S rDNA T-RFLP approaches to study bacterial communities in soil microcosms treated with chromate as perturbing agent. *Microb Ecol* **50**, 375-384.
- Menkis, A., Vasiliauskas, R., Taylor, A.F., Stenlid, J., Finlay, R. (2005). Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* **16**, 33-41.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11**, 31-46.
- Mikami, Y., Yazawa, K., Maeda, A., Uno, J., Kubo, A., Saito, N., Kawakami, N. (1991). Antifungal activity of SL-1, a beta-nitrostyrene type oigment and Its synthetic congeners. *J Antibiot* **44**, 1454-456.
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Jakubowska, A., Pulawska, J., Berczyński. S. (2011). *Pseudomonas graminis* as a biocontrol agent of fire blight. *Acta Horti* **896**, 471-476.
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Jurado, V., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C., Saiz-Jimenez, C. (2013). Biomineralization by cave dwelling microorganisms. En: Sanjurjo Sánchez, J. (Ed.). *Advances in Geochemistry Research*. Nova Science Publishers, 77-105.
- Miller, A.Z., Pereira, M.F.C., Calaforra, J.M., Forti, P., Dionisio, A., Saiz-Jimenez, C. (2014). Siliceous speleothems and associated microbe-mineral interactions from Ana Heva lava tube in Easter Island (Chile). *Geomicrobiol J* **31**, 236-245.

- Miller, A.Z., De la Rosa, J.M., Pereira, M.F.C., Garcia-Sanchez, A.M., Jurado, V., Fernández, O., González-Pérez, J.A., Saiz-Jimenez, C. (2016a). Honey-like scented deposits in a lava tube from La Palma Island (Spain). 21st International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis. 9-12 mayo, Nancy, Francia.
- Miller, A.Z., De la Rosa, J.M., Jiménez-Morillo, N.T., Pereira, M.F.C., González-Pérez, J.A., Calaforra, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2016b). Analytical pyrolysis and stable isotope analyses reveal past environmental changes in coralloid speleothems from Easter Island (Chile). *J Chromatogr A* **1461**, 144-152.
- Miller, A.Z., Garcia-Sanchez, A.M., Martin-Sanchez, P.M., Costa Pereira, M.F., Spangenberg, J.E., Jurado, V., Dionisio, A., Afonso, M.J., Helder, I.I., Hermosín, B., Saiz-Jimenez, C. (2018). Origin of abundant moonmilk deposits in a subsurface granitic environment. *Sedimentology* **65**, 1482-1503.
- Miller, J.H. (1992). A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitova, M., Iliev, M., Nováková, A., Gorbushina, A., Groudeva, V., Martin-Sanchez, P. (2017). Diversity and biocide susceptibility of fungal assemblages dwelling in the Art Gallery of Magura Cave, Bulgaria. *Int J Speleol* **46**, 67-80.
- Miyadoh, S. (1997). Atlas of actinomycetes. Asakura Publishing Co, Tokyo, Japan.
- Morillo Pérez, J., García-Ribera, R., Quesada, T., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. (2008). Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 2699-2704.
- Mosher, J.J. Bowman, B., Bernberg, E.L., Shevchenko, O., Kan, J., Korlach, J., Kaplan, L.A. (2014). Improved performance of the PacBio SMRT technology for 16S rDNA sequencing. *J Microbiol Methods* **104**, 59-60.
- Motohashi, K., Sue, M., Furihata, K., Ito, S., Seto, H. (2008). Terpenoids produced by actinomycetes: napyradiomycins from *Streptomyces antimycoticus* NT17. *J Nat Prod* **71**, 595-601.

- Mual, P., Singh, N.K., Verma, A., Schumann, P., Krishnamurthi, S., Dastager, S., Mayilraj, S. (2016). Reclassification of *Bacillus isronensis* Shivaji et al. 2009 as *Solibacillus isronensis* comb. nov. and emended description of genus *Solibacillus* Krishnamurthi et al. 2009. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 2113-2120.
- Mudgil, D., Baskar, S., Baskar, R., Paul, D., Shouche, Y.S. (2018). Biomineralization Potential of *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus stabekisii* and *Staphylococcus epidermidis* strains in vitro isolated from speleothems, Khasi Hill Caves, Meghalaya, India. *Geomicrobiol J* **35**, 675-694.
- Muñoz-Mérida, A., Viguera, E., Claros, M.G., Trelles, O., Pérez-Pulido, A.J. (2014). Sma3s: a three-step modular annotator for large sequence datasets. *DNA Res* **21**, 341-353.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-41.
- Myer, P.R., Kim, M., Freetly, H.C., Smith, T.P. (2016). Metagenomic and near full-length 16S rRNA sequence data in support of the phylogenetic analysis of the rumen bacterial community in steers. *Data Brief* **8**, 1048-1053.
- Myers, E.W., Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* **4**, 11-7.
- Nakaew, N., Pathom-aree, W., Lumyong, S. (2009). Generic diversity of rare Actinomycetes from Thai cave soils and their possible use as new bioactive compounds. *Actinomycetologica* **23**, 21-26.
- Natarajan, K A. (2016). Biomineralization and biobeneficiation of bauxite. *T Indian I Metals* **69**, 15-21.
- Neilson, J.W., Jordan, F.L., Maier, R.M. (2013). Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J Microbiol Meth* **92**, 256-63.
- Newell, K.V., Thomas, D.P., Brekasis, D., Paget, M.S. (2006). The RNA polymerase-binding protein RbpA confers basal levels of rifampicin resistance on *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **60**, 687-696.

- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2010). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**, 311-335.
- Neysens, P., Messens, W., De Vuyst, L. (2003). Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int J Food Microbiol* **88**, 29-39.
- Nieves-Rivera, A., Santos-Flores, C.J., Dugan, F.M., Miller, T.E. (2009). Guanophilic fungi in three caves of southwestern Puerto Rico. *Int J Speleol* **38**, 61-70.
- Nogawa, T., Okano, A., Takahashi, S., Uramoto, M., Konno, H., Saito, T., Osada, H. (2010). Verticilactam, a new macrolactam isolated from a microbial metabolite fraction library. *Org Lett* **12**, 4564-4567.
- Nogi, Y., Yoshizumi, M., Hamana, K., Miyazaki, M., Horikoshi, K. (2014). *Povalibacter uvarum* gen. nov., sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading bacterium isolated from grapes. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 2712-2717.
- Noland, B.W., Newman, J.M., Hendle, J., Badger, J. (2002). Structural studies of *Salmonella typhimurium* ArnB (PmrH) aminotransferase. *Structure* **10**, 1569-1580.
- Nørskov-Lauritsen, N., Bruun, B., Kilian, M. (2005). Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 449-456.
- Northup, D.E., Lavoie, K.H. (2001). Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiol J* **18**, 199-222.
- Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O., Dahm, C. (2003). Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environ Microbiol* **5**, 1071-1086.
- Northup, D.E., Melim, L.A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L., Riquelme, C. (2011). Lava cave microbial communities within mats and secondary mineral deposits: implications for life detection on other planets. *Astrobiology* **11**, 1-18.

- Nováková, A. (2009). Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *Int J Speleol* **38**, 71-82.
- Nováková, A., Hubka, V., Saiz-Jimenez, C. (2014). Microscopic fungi isolated from cave air and sediments in the Nerja Cave-preliminary results. *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*, 239-245.
- Nováková, A., Kubátová, A., Sklenář, F., Hubka, V. (2018). Microscopic fungi on cadavers and skeletons from cave and mine environments. *Czech Mycology* **70**, 101-121.
- O'Connor, C. (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Nature Education* **1**, 171.
- O'Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufo, S., y col. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* **4**, 733-745.
- Ogita, T., Gunji, S., Fukazawa, Y., Terahara, A., Kinoshita, T., Nagaki, H., Beppu, T. (1983). The structures of fosfazinomycins A and B. *Tetrahedron Lett* **24**, 2283-2286.
- Ogorek, R., Dyląg, M., Visnovska, Z., Tancinova, D., Zalewski, D. (2016). Speleomycology of air and rock surfaces in Driny Cave (Lesser Carpathians, Slovakia). *J Caves Karst Stud* **78**, 119-127.
- Oliveira, C., Gunderman, L., Coles, C.A., Lochmann, J., Parks, M., Ballard, E., Glazko, G., Rahmatallah, Y., Tackett, A.J., Thomas, D.J. (2017). 16S rRNA gene-based metagenomic analysis of ozark cave bacteria. *Diversity (Basel)* **9**, 31.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., y col. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 12215-12220.
- Onac, B.P., Forti, P. (2011). Minerogenetic mechanisms occurring in the cave environment: an overview. *Int J Speleol* **40**, 79-98.
- Onac, B.P. (2012). Minerals. En: White, W.B., Culver, D.C. (Eds.). *Encyclopedia of Caves* (Second Edition). Elsevier Academic Press, Chennai, 499-508.

- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 56-63.
- Oren, A. (2006). Life at high salt concentrations. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. New York: Springer, 263-282.
- Osorio, N., Habte, M. (2013). Synergistic effect of a phosphate-solubilizing fungus and an arbuscular mycorrhizal fungus on leucaena seedlings in an Oxisol fertilized with rock phosphate. *Botany* **91**, 274-281.
- Otani, S., Takatsu, M., Nakano, M., Kasai, S., Miura, R. (1974). Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* **27**, 88-89.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G. (1985). Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* **51**, 4-12.
- Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Pacwa-Płociniczak, M., Czapla, J., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z. (2019). The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicol Environ Saf* **169**, 615-622.
- Palmer, A.N. (1991). Origin and morphology of limestone caves. *GSA Bulletin* **103**, 1-21.
- Palomo, S., González, I., De la Cruz, M., Martín, J., y col. (2013). Sponge-derived *Kocuria* and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. *Mar Drugs* **11**, 1071-1086.
- Pan, T., He, H., Wang, X., Shen, Y., y col. (2017). *Bacillus solisilvae* sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**, 4449-4455.
- Pastor, N., Pinero, D., Valdes, A.M., Soberon, X. (1990). Molecular evolution of class A beta-lactamases: phylogeny and patterns of sequence conservation. *Mol Microbiol* **4**, 1957-1965.

- Patzer, S.I., Braun, V. (2010). Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *J Bacteriol* **192**, 426-435.
- Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L., Brune, A. (2012). 'Methanoplasmatales': *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8245-8253.
- Pawlowski, J., Lecroq, B. (2010). Short rdna barcodes for species identification in foraminifera. *J Eukaryot Microbiol* **57**, 197-205.
- Pawlowski, A.C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H.A., McArthur, A.G., Wright, G.D. (2016). A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nat Commun* **7**, 13803.
- Pechère J.C. (1996). Streptogramins. A unique class of antibiotics. *Drugs* **51**, 13-19.
- Pérez-González, T., Valverde-Tercedor, C., Jiménez-López, J. (2010). Bacterial biomineralization of magnetite and its applications. *Seminarios SEM* **7**, 58-74.
- Perron, G.G., Whyte, L., Turnbaugh, P.J., Goordial, J., Hanage, W.P., Dantas, G., Desai, M.M. (2015). Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS One* **10**, e0069533.
- Perry, J.A., Westman, E.L., Wright, G.D. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol* **21**, 45-50.
- Pester, M., Schleper, C., Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* **14**, 300-306.
- Pi, Y., Chen, B., Bao, M., Fan, F., Cai, Q., Ze, L., Zhang, B. (2017). Microbial degradation of four crude oil by biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. *Bioresour Technol* **232**, 263-269.

- Pierson, L.S., Keppenne, V.D., Wood, D.W. (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J Bacteriol* **176**, 3966-3974.
- Pitt, J.I. (1980). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, UK: Academic Press.
- Pohlman, J.W., Iliffe, T.M., Cifuentes, L.A. (1997). A stable isotope study of organic cycling and the ecology of an anchialine cave ecosystem. *Mar Ecol Prog Ser* **155**, 17-27.
- Polyak, V.J., Provencio, P.P. (2006). Protecting lava tube caves. En: Hildreth-Werker, V., Werker, J.C. (Eds.). Cave Conservation and Restoration. National Speleological Society, Huntsville, 133-140.
- Polz, M.F., Cavanaugh, C.M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *J Appl Environ Microbiol* **64**, 3724-3730.
- Porca, E., Jurado, V., Žgur-Bertok, D., Saiz-Jimenez, C., Pašić, L. (2012). Comparative analysis of yellow microbial communities growing on the walls of geographically distinct caves indicates a common core of microorganisms involved in their formation. *FEMS Microbiol Ecol* **81**, 255-66.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2008). Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *J Appl Microbiol* **104**, 681-91.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M. (2009). Comparing bacterial community fingerprints from white colonizations in Altamira Cave (Spain). *World J Microbiol Biot* **25**, 1347-52
- Poulson, T.L., White, W.B. (1969). The cave environment. *Science* **165**, 971-981.
- Qian, C., Wu, X., Teng, Y., Zhao, W., Li, O., Fang, S., Huang, Z.H., Gao, H. (2012). Battacin (Octapeptin B5), a New Cyclic Lipopeptide antibiotic from *Paenibacillus tianmuensis* active against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1458-1465.

- Qu, Y., Spain, J.C. (2011). Catabolic pathway for 2-nitroimidazole involves a novel nitrohydrolase that also confers drug resistance. *Environ Microbiol* **13**, 1010-1017.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl Acids Res* **41**, 590-596.
- Rabodonirina, S., Rasolomampianina, R., Krier, F., Drider, D., Merhaby, D., Net, S., Ouddane, B. (2019). Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *J Environ Manage* **232**, 1-7.
- Radhakrishnan, M., Venugopal, G., Ramasamy, B. Kumar, V. (2015). Effect of critical medium components and culture conditions on anti-tubercular pigment production from novel *Streptomyces* sp. D25 isolated from Thar desert, Rajasthan. *J App Pharm Sci* **5**, 015-019.
- Rahpeyma, S., Dilmaghani, A., Raheb, J. (2018). Evaluation of desulfurization activity of SPION nanoparticle-coated bacteria in the presence of magnetic field. *Appl Nanosci* **8**, 1951-1972.
- Rančić, A., Soković M., Karioti, A., Vukojević, J., Skaltsa, H. (2006). Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environ Toxicol Pharmacol* **22**, 80-84.
- Ranjan, R., Jadeja, V. (2017). Isolation, characterization and chromatography-based purification of antibacterial compound isolated from rare endophytic actinomycetes *Micrococcus yunnanensis*. *J Pharm Anal* **7**, 343-347.
- Reed, D.W., Fujita, Y., Delwiche, M.E., Blackwelder, D.B., Sheridan, P.P., Uchida, T., Colwell, F.S. (2002). Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a forearc basin. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3759-3770.
- Reller, L.B., Weinstein, M.P., Petti, C.A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis* **44**, 1108-1114.

- Remali, J., Sarmin, N., Ng, C., Tiong, J., Aizat, W., Keong, L., Zin, N. (2017). Genomic characterization of a new endophytic *Streptomyces kebangsaanensis* identifies biosynthetic pathway gene clusters for novel phenazine antibiotic production. *PeerJ* **11**, E3738.
- Reshetnikov, A.S., Khmelenina, V.N., Trotsenko, Y.A. (2006). Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylobacterium alcaliphilum* 20Z". *Arch Microbiol* **184**, 286-297.
- Rezakhani, L., Motesharezadeh, B., Tehrani, M., Etesami, H., Mirseyed Hosseini, H. (2019). Phosphate-solubilizing bacteria and silicon synergistically augment phosphorus (P) uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) plant fertilized with soluble or insoluble P source. *Ecotoxicol Environ Saf* **173**, 504-513.
- Rhuland, L.E., Work, E., Denman, R.F., Hoare, D.S. (1955). The behaviour of the isomers of 2,6-diaminopimelic acid on paper chromatograms. *J Am Chem Soc* **77**, 4844-4846.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 19126-19131.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., Peplies, J. (2015). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. **32**, 929-931.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., y col. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**, 431-437.
- Ripa, F.A., Nikkon, F., Zaman, S., Khondkar, P. (2009). Optimal conditions for antimicrobial metabolites production from a new *Streptomyces* sp. RUPA-08PR isolated from bangladeshi soil. *Mycobiology* **37**, 211-214.
- Riquelme, C. Rigal, F., Hathaway, J.J.M., Northup, D.E., Spilde, M.N., Borges, P.A.V., Gabriel, R., Amorim, I.R., Dapkevicius, M.L.N.E. (2015a). Cave microbial community composition in oceanic islands: Disentangling the effect of different colored mats in diversity patterns of Azorean lava caves. *FEMS Microbiol Ecol* **91**, 1-12.

- Riquelme, C., Marshall Hathaway, J.J.M., Enes Dapkevicius, M., Miller, A.Z., Kooser, A., Northup, D.E., Jurado, V., Fernandez, O., Saiz-Jimenez, C., Cheeptham, N. (2015b). Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Front Microbiol* **6**, 1342.
- Riquelme, C., Enes Dapkevicius, M.L., Miller, A.Z., Charlop-Powers, Z., Brady, S., Mason, C., Cheeptham, N. (2017). Biotechnological potential of *Actinobacteria* from Canadian and Azorean volcanic caves. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, 843-857.
- Rochín-Medina, J.J., Ramírez-Medina, H.K., Rangel-Peraza, J.G., Pineda-Hidalgo, K.V., Iribe-Arellano, P. (2018). Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Sci Technol Int* **24**, 35-42.
- Rodrigue, S., Malmstrom, R.R., Berlin, A.M., Birren, B.W., Henn, M.R., Chisholm, S.W. (2009). Whole genome amplification and de novo assembly of single bacterial cells. *PLoS One* **4**, e6864.
- Rodrigues, L., Banat, I., Teixeira, J., Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* **57**, 609-618.
- Rogers, N. (1999). The composition and origin of magmas. En: Sigurdsson, H., Houghton, B., McNutt, S., Rymer, H., Stix, J. (Eds.). *The Encyclopedia of Volcanoes*. Academic Press, Londres, 93-112.
- Roncevic, Z., Pajcin, I., Cvetkovic, D., Dodic, S., Grahovac, J., Dodic, J. (2018). Optimization of cultivation medium composition for production of bioactive compounds effective against *Penicillium* sp. *Pesticidi i fitomedicina* **33**, 27-37.
- Rong, X., Guo, Y. Huang, Y. (2009). Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. solvifaciens. *Syst Appl Microbiol* **32**, 314-322.
- Rong, X., Huang, Y. (2014). Multi-locus sequence analysis: Taking prokaryotic systematics to the next level. En Goodfellow, M., Sutcliffe, I., Chun, J. (Eds.) *Methods in Microbiology*. Academic Press. **41**, 221-251.

- Rosselló-Móra, R. (2006). DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. En: Stackebrandt, E. (Ed.) *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Springer-Verlag, Berlin, 23-50.
- Rossi, G. (1979). Potassium recovery through leucite bioleaching: possibilities and limitations. En: Murr, L.E., Torma, A.E., Brierley, J. E. (Eds.) *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Phenomena*. New York: Academic Press, 279-319.
- Roth, J.R., Benson, N., Galitski, T., Haack, K., Lawrence, J.G., Miesel, L. (1996). Rearrangements of the bacterial chromosome: formation and applications. En: Neidhardt, F.C., Curtiss, R., y col. (Ed.) *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C, 2256-2276.
- Rouf, M.A., Stokes, J.L. (1964). Morphology, nutrition and physiology of *Sphaerotilus discophorus*. *Arch Mikrobiol* **49**, 132-149.
- Rudkin, G.T., Stollar, B.D. (1977). High resolution of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* **265**, 472-474.
- Ruiu L. (2013). *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. *Insects* **4**, 476-492.
- Rusakov, A.V, Vlasov, A.D., Zelenskaya, M.S., Frank-Kamenetskaya, O.V., Vlasov, D.Y., Panova, E.G. (Eds.) (2016). *Biogenic-abiogenic interactions in natural and anthropogenic systems*. Springer International Publishing, 537 pp.
- Ruschmann, G. (1952). *Streptomyces mirabilis* and miramycin. i. | *Streptomyces mirabilis* und das miramycin. i." *Die Pharmazie* **7**, 542-550.
- Rusznayák, A., Akob, D.M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K.U., Neu, T.R., Frosch, T., Popp, J., Keiner, R., Geletneky, J., Katzschmann, L., Schulze, E.D., Küsel, K. (2012). Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic herrenberg cave. *Appl Environ Microbiol* **78**, 1157-67.
- Sadeghi, A., Soltani, B., Nekouei, M., Jouzani, G., Mirzaei, H., Sadeghizadeh, M. (2014). Diversity of the ectoines biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. *Microbiol Res* **169**, 699-708.

- Sahay, H., Yadav, A.N., Singh, A.K., Singh, S., Kaushik, R., Saxena, A.K. (2017). Hot springs of Indian Himalayas: Potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. *Biotech* **7**, 118.
- Sahm, H., Rohmer, M., Bringer-Meyer, S., Sprenger, G.A. Welle, R. (1993). Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. *Adv Microb Physiol* **35**, 247-273.
- Sahu, M.K., Murugan, M., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L. (2007). Occurrence and distribution of actinomycetes in marine environs and their antagonistic activity against bacteria that is pathogenic to shrimps. *Isr J Aquacult-Bamid* **59**, 155-161.
- Saiki, R.K. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Saiz-Jimenez, C., Hermosin, B. (1999). Thermally assisted hydrolysis and methylation of dissolved organic matter in dripping waters from the Altamira Cave. *J Anal Appl Pyrol* **49**, 337-347.
- Saiz-Jimenez, C. (2012). Microbiological and environmental issues in show caves. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 2453-2464.
- Sand, W. (1997). Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates - a general mechanistic review. *Int Biodeterior Biodegradation* **40**, 183-190.
- Sanger, F., Coulson, A. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**, 441-448.
- Sarbu, S.M., Kane, T.C., Kinkle, B.K. (1996). A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science* **272**, 1953-1955.
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Ullah, M.A., Sessitsch, A., Hafeez, F.Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS one* **13**, e0198107.
- Sassanfar, M., Kranz, J.E., Gallant, P., Schimmel, P., Shiba, K. (1996). A eubacterial *Mycobacterium tuberculosis* tRNA synthetase is eukaryote-like and

- resistant to a eubacterial-specific antisynthetase drug. *Biochemistry* **35**, 9995-10003.
- Sato, Y., Nishihara, H., Yoshida, M., Watanabe, M., Rondal, J.D., Ohta, H. (2004). Occurrence of hydrogen-oxidizing *Ralstonia* species as primary microorganisms in the Mt. Pinatubo volcanic mudflow deposits. *Soil Sci Plant Nutr* **50**, 855-861.
- Saunders, L.P., Bischoff, K.M., Bowman, M.J., Leathers, T.D. (2019). Inhibition of *Lactobacillus* biofilm growth in fuel ethanol fermentations by *Bacillus*. *Bioresour Technol* **272**, 156-161.
- Saxena, K., Yadav, U. (2018). In vitro assessment of antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of moss *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. *Physiol Mol Biol Plants* **24**, 1203-1208.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. (2002a). Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environ Microbiol* **4**, 392-400.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. (2002b). Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol Lett* **211**, 7-11.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. (2004). Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma). *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 235-247.
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S.A. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* **55**, 66-69.
- Schenk, H.J., Jackson, R.B. (2002). The global biogeography of roots. *Ecol Monogr* **72**, 311-328.
- Schloss, J.A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat Biotechnol* **26**, 1113-5.

- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, y col. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537-7541.
- Schneider, D., Reimer, A., Hahlbrock, A., Arp, G., Daniel, R. (2015). Metagenomic and metatranscriptomic analyses of bacterial communities derived from a calcifying karst water creek biofilm and tufa. *Geomicrobiol J* **32**, 316-331.
- Scholler, C.E., Gurtler, H., Pedersen, R., Molin, S., Wilkins, K. (2002). Volatile metabolites from actinomycetes. *J Agric Food Chem* **50**, 2615-2621.
- Schrempf, H. (2013). *Actinobacteria* within soils: capacities for mutualism, symbiosis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* **342**, 77-78.
- Schrenk, M.O., Edwards, K.J., Goodman, R.M., Hamers, R.J., Banfield, J.F. (1998). Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage. *Science* **279**, 1519-1522.
- Schultheis, E., Dreger, M.A., Nimtz, M., Wray, V., Hempel, D.C., Nörtemann, B. (2008). Structural characterization of the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa* strain DSM 13101. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 1017-1024.
- Schütze, E., Klose, M., Merten, D., Nietzsche, S., Senftleben, D., Roth, M., Kothe, E. (2014). Growth of streptomycetes in soil and their impact on bioremediation. *J Hazard Mater* **267**, 128-135.
- Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T.L., Morgan, X.C., Garrett, W.S., Huttenhower, C. (2013). Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol Syst Biol* **9**, 666.
- Selinger, D.W., Saxena, R.M., Cheung, K.J., Church, G.M., Rosenow, C. (2003). Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* **13**, 216-223.
- Senesi, S., Celandroni, F., Tavanti, A., Ghelardi, E. (2001). Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy. *Appl Environ Microbiol* **67**, 834-839.

- Seo, D., Lee, Y., Kim, K., Jung, W. (2016). Antifungal activity of chitinase obtained from *Paenibacillus ehimensis* MA2012 against conidial of *Collectotrichum gloeosporioides* in vitro. *Microb Pathog* **96**, 10-14.
- Shafiee, A., Motamedi, H., Chen, T. (1994). Enzymology of FK-506 biosynthesis. Purification and characterization of 31-O-desmethylFK-506 O:methyltransferase from *Streptomyces* sp. MA6858. *Eur J Biochem* **225**, 755-764.
- Shahi, S.K., Freedman, S.N., Mangalam, A.K. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *Gut Microbes* **8**, 607-615.
- Shahnaz, D., Samreen, W., Marium, T., Zaki, M.J. (2010). Application of *Bacillus* species in the control of root rot diseases of crop plant. *Arch Phytopathology Plant Protect* **43**, 412-418.
- Shannon, C.E., Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication. Univ of Illinois Press.
- Sharma, P. (2010). Streptomycin induced protein expression analysis in *Mycobacterium tuberculosis* by two-dimensional gel electrophoresis & mass spectrometry. *Indian J Med Res* **132**, 400-408.
- Shekar, P., Anuradha, Radhakrishnan, M., Balagurunathan, R. (2011). Effect of critical medium components on antimicrobial compound production from marine streptomyces species (A2) by one factor at a time method. *J Chem Pharm Res* **3**, 872-876.
- Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 285-295.
- Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M.J., Kieser, H.M., Bibb, M.J., Hopwood, D.A. (1989). Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22. *EMBO J* **8**, 2717-2725.
- Sheu S, Li Y, Chen W. (2016). *Piscinibacterium candidicorallinum* gen. nov., sp. nov., a member of the order *Burkholderiales* isolated from a fish pond. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 5260-5267.

- Shi, W., Chen, J., Feng, J., Cui, P., y col. (2014). Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect* **3**, e58.
- Shi, Y., Zwolinski, M.D., Schreiber, M.E., Bahr, J.M., Sewell, G.W., Hickey, W.J. (1999). Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2143-50.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**, 313.
- Simkiss, K., Wilbur, K.M. (1989). Biomineralization. Cell bology and mineral deposition. Academic Press, San Diego.
- Simpson, E.H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* **163**, 688.
- Singh, B., Gupta, V., Passari, A. (2018). *Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier.
- Singh, C., Parmar, R., Jadon, P., Kumar, A. (2017). Optimization of cultural conditions for production of antifungal bioactive metabolites by *Streptomyces spp.* isolated from soil. *IJCMAS* **6**, 386-396.
- Singh, Ls., Mazumder, S., Bora, T.C. (2009). Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J Mycol Med* **19**, 225-233. Web.
- Singh, R., Barry, C.E., Boshoff, H.I. (2010). The three RelE homologs of *Mycobacterium tuberculosis* have individual, drug-specific effects on bacterial antibiotic tolerance. *J Bacteriol* **192**, 1279-1291.
- Singh, V., Tripathi, C., Bihari, V. (2008). Production, optimization and purification of an antifungal compound from *Streptomyces capoamus* MTCC 8123. *Med Chem Res* **17**, 94-102.
- Skellam, E.J., Stewart, A.K., Strangman, W.K., Wright, J.L. (2013). Identification of micromonolactam, a new polyene macrocyclic lactam from two marine *Micromonospora* strains using chemical and molecular methods:

- clarification of the biosynthetic pathway from a glutamate starter unit. *J Antibiot (Tokyo)* **66**, 431-41.
- Slukin, A.D. Bortnikov, N.S., Zhegallo, E.A., Zaytseva, L.V., Zhukhlistov, A.P., Mokhov, A.V., Boeva, N.M. (2016). Biomineralization in bauxitic laterites of modern and paleotropics of earth. En: Frank-Kamenetskaya, O., Panova, E., Vlasov, D. (Eds.) Biogenic-abiogenic interactions in natural and anthropogenic systems. Lecture Notes in Earth System Sciences. Springer, Cham, 67-74.
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Snider, J. (2010). Comparison of microbial communities on roots, ceilings and floors of two lava tube caves in New Mexico. MSci Thesis. University of New Mexico, New Mexico.
- Solanki, R., Khanna, M., Lal, R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol* **48**, 410-431.
- Soler, T., Santos, B., Mayor, L., Fernández, A., Sánchez, J.A., Cardeñoso, L., Domingo, D. (2018). Peritonitis caused by *Blastomonas natatoria* in a patient submitted to peritoneal dialysis. *Rev Esp Quimioter* **31**, 175-177.
- Song, M.M., Veeranagouda, Y., Ganzorig, M., Lee, K. (2018). Circular pellicles formed by *Pseudomonas alkylphenolica* KL28 are a sophisticated architecture principally designed by matrix substance. *J Microbiol* **56**, 790-797.
- Soponsathien, S. (1998). Some characteristics of ammonia fungi 1. In relation to their ligninolytic enzyme activities. *J Gener Appl Microbiol* **44**, 337-345.
- Sorokin, D.Y., Lysenko, A.M., Mityushina, L.L., Tourova, T.P., Jones, B.E., Rainey, F.A., Robertson, L.A., Kuenen, G.J. (2001). *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 565-580.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Braker, G., Muyzer, G. (2007). *Thiohalomonas denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Thiohalomonas nitratreducens* sp.

- nov., novel obligately chemolithoautotrophic, moderately halophilic, thiodenitrifying *Gammaproteobacteria* from hypersaline habitats. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**,1582-1589.
- Speicher, M.R., Carter, N.P. (2005). The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **6**, 782-792.
- Sripreechasak, P. (2014). Characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from soils in southern Thailand. *J Appl Pharm Sci* **4**, 24-31.
- Srivibool, R., Sukchotiratana, M. (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J Sci Technol* **28**, 493-499.
- Staley, J.T., Palmer, F., Adams, J.B. (1982). Microcolonial fungi: common inhabitants on desert rocks? *Science* **215**, 1093-1095.
- Stapley, E.O., Mata, J.M., Miller, I.M., Demny, T.C., Woodruff, H.B. (1963). Antibiotic msd-235. i. production by *Streptomyces avidinii* and *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **161**, 20-27.
- Steel, K.J. (1961). The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J Gen Microbiol* **25**, 297-306.
- Sterflinger, K. (2000). Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol J* **17**, 97-124.
- Stewart, E.J. (2012). Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* **194**, 4151-4160.
- Stewart, R.D., Auffret, M.D., Warr, A., Wiser, A.H., Press, M.O., Langford, K.W., y col. (2018). Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nat Commun* **9**, 870.
- Stomeo, F., Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C. (2008). *Pseudonocardia* in white colonizations in two caves with Paleolithic paintings. *Int Biodeterior Biodegrad* **62**, 483-486.
- Strobel, G.A., Woapong, F.J., Harper, J.K., Arif, A.M., Grant, D.M., Fung, P.C.W., Chan, K. (2002). Isopestacin, an isobenzopuranone from *Pestalotiopsis*

- microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* **60**, 179-183.
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K.Q., Yang, J. (2011). Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 993-1003.
- Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Nishiwaki, R., Komori, A., Uda, N., Isono, K., Fujiki, H. (1995). Tautomycin: An inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A but not a tumor promoter on mouse skin and in rat glandular stomach. *J Cancer Res Clin Oncol* **121**, 621-627.
- Sugiyama, J., Kiyuna, T., Nishijima, M., An, K.D., Nagatsuka, Y., Tazato, N., Handa, Y., Hata-Tomita, J., Sato, Y., Kigawa, R., Sano, C. (2017). Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus. *J Gen Appl Microbiol* **63**, 63-113.
- Sujarit, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Pathom-Aree, W., Lumyong, S. (2016). *Streptomyces palmae* sp. nov., isolated from oil palm (*Elaeis guineensis*) rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 3983-3988.
- Sul, W.J., Cole, J.R., Jesus, E., Wang, Q., Farris, R.J., Fish, J.A., Tiedje, J.M. (2011). Bacterial community comparisons by taxonomy-supervised analysis independent of sequence alignment and clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14637-14642.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., Hahm, Y. T. (2015). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol* **61**, 93-103.
- Sun, L.N., Yang, E.D., Wei, J.C., Tang, X.Y., Cao, Y.Y., Han, G.M. (2015). *Caulobacter flavus* sp. nov., a stalked bacterium isolated from rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 4374-4380.
- Sungthong, R., Nakaew, N. (2015). The genus *Nonomuraea*: a review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. *J Basic Microbiol* **55**, 554-565.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing. *PLoS One* **9**, e105592.

- Takeuchi, M., Hamana, K., Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1405-1417.
- Talebi, S., Makhdoumi, A., Bahreini, M., Matin, M.M., Moradi, H.S. (2018). Three novel *Bacillus* strains from a traditional lacto-fermented pickle as potential probiotics. *J Appl Microbiol* **125**, 888-896.
- Tamura T, Ishida Y, Ootoguro M, Hatano K, Suzuki K. (2008). Classification of 'Streptomyces tenebrarius' Higgins and Kastner as *Streptoalloteichus tenebrarius* nom. rev., comb. nov., and emended description of the genus *Streptoalloteichus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 688-691.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-2729.
- Tang, L, Zhang, Y.X., Hutchinson, C.R. (1994). Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol* **176**, 6107-6119.
- Tazaki, K. (2005). Microbial formation of a halloysite-like mineral. *Clays Clay Min* **53**, 224-233.
- Teare, J.M., Islam, R., Flanagan, R., Gallagher, S., Davies, M.G., Grabau, C. (1997). Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques* **22**, 1170-1174.
- Teeling, H., Meyerdierks, A., Bauer, M., Amann, R. and Glöckner, F.O. (2004a) Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environ Microbiol* **6**, 938-947.
- Teeling, H., Waldmann, J., Lombardot, T., Bauer, M., Glöckner, F.O. (2004b). TETRA: a web-service and a stand-alone program for the analysis and comparison of tetranucleotide usage patterns in DNA sequences. *BMC bioinformatics* **5**, 163.

- Tescari, M., Visca, P., Frangipani, E., Bartoli, F., Rainer, L., Caneva, G. (2018). Celebrating centuries: Pink-pigmented bacteria from rosy patinas in the House of Bicentenary (Herculaneum, Italy). *J Cult Herit* **34**, 43-52.
- Tetu, S.G., Breakwell, K., Elbourne, L.D.H., Holmes, A.J., Gillings, M.R., Paulsen, I.T. (2013). Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *ISME J* **7**, 1227-1236.
- The UniProt Consortium (2018). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **46**, 2699.
- Thiara, A.S., Cundliffe, E. (1993). Expression and analysis of two *gyrB* genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol Microbiol* **8**, 495-506.
- Thijs, S., Op De Beeck, M., Beckers, B., Truyens, S., Stevens, V., Van Hamme, J.D., Weyens, N., Vangronsveld, J. (2017). Comparative evaluation of four bacteria-specific primer pairs for 16s rna gene surveys. *Front Microbiol* **8**, 494.
- Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Girivasan, K.P., Venkatachalam, A., Geetha, V., Ravishankar, J.P., Doble, M. (2012). Fungal symbionts of marine sponges from Rameswaram, southern India: species composition and bioactive metabolites. *Fungal Divers* **55**, 37-46.
- Tian, J., Zhang, G., Ju, Y., Tang, N., Li, J., Jia, R., Feng, J. (2018). Five novel carbapenem-hydrolysing OXA-type β -lactamase groups are intrinsic in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* **73**, 3279-3284.
- Tietz, J.I., Schwalen, C.J., Patel, P.S., Maxson, T., Blair, P.M., Tai, H.C., Zakai, U.I., Mitchell, D.A. (2017). A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. *Nat Chem Biol* **13**, 470-478.
- Tiwari, K., Gupta, R.K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* **32**, 108-132.
- Tomczyk-Żak K., Zielenkiewicz U. (2015). Microbial diversity in caves. *Geomicrobiol J* **33** 20-38.

- Tomita K, Uenoyama Y, Numata K, Sasahira T, Hoshino Y, Fujisawa K, Tsukiura H, Kawaguchi H. (1978). *Streptoalloteichus*, a new genus of the family Actinoplanaceae. *J Antibiot* **31**, 497-510.
- Tomova, I., Lazarkevich, I., Tomova, A., Kambourova, M., Vasileva-Tonkova, E. (2013). Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *Int J Speleol* **42**, 65-76.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Konneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A., Schleper, C. (2011). *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 8420-8425.
- Trask, B.J. (2002). Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* **3**, 769-778.
- Tremblay, J., Singh, K., Fern, A., y col. (2015). Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol* **6**, 771.
- Tvrzová, L., Prokop, Z., Navrátilová, J., Müllerová, R., Neca, J. (2006). Development of a microtiter plate-based method for determination of degradation profile of nitrophenolic compounds. *J Microbiol Methods* **65**, 551-556.
- Ulanova, D., Goo, KS. (2015). Diversity of actinomycetes isolated from subseafloor sediments after prolonged low-temperature storage. *Folia Microbiol* **60**, 211.
- Urbani, F., Compère, P., Willems, L. (2005). Opal-A speleothems of Wei-Assiputepui, Roraima Province, Brazil. *Bo. Soc Venezol Espeleol* **39**, 21-26.
- Urzi, C., De Leo, F., Bruno, L., Albertano, P. (2010). Microbial diversity in paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microb Ecol* **60**, 116-129.
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., Loor, J.J. (2017). What are omics sciences? En: Ametaj B.N. (Ed.) *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*, Cham, Springer International Publishing, 1-7.

- Valdes-Stauber N., Scherer S. (1994). Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3809-3814.
- Van de Peer, Y., Chapelle, S., De Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucl Acids Res* **24**, 3381-91.
- Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* **30**, 418-426.
- Vanderwolf, K.J., McAlpine, D.F., Malloch, D., Forbes, G.J. (2013). Ectomycota associated with hibernating bats in Eastern Canadian caves prior to the emergence of White-nose síndrome. *Northeast Nat (Steuben)* **20**, 115-130.
- Vaughan, M., Maier, R., Pryor, B. (2011). Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *Int J Speleol* **40**, 65-77.
- Velivelli, S.L., De Vos, P., Kromann, P., Declerck, S., Prestwich, B.D. (2014). Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. *Trends Biotechnol* **32**, 493-496.
- Veni, G. (2002). Revising the karst map of the United States. *J Caves Karst Stud* **64**, 45-50.
- Verluyten, J., Messens, W., De Vuyst, L. (2004). Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2271-2278.
- Vidal Romaní, J.R., Sanjurjo Sánchez, J., Vaqueiro Rodríguez, M., Fernández Mosquera, D. (2010). Speleothem development and biological activity in granite cavities. *Géomorphologie* **4**, 337-346.
- Vieira, S., Luckner, M., Wanner, G., Overmann, J. (2017). *Luteitalea pratensis* gen. nov., sp. nov. a new member of subdivision 6 *Acidobacteria* isolated from temperate grassland soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**, 1408-1414.
- Vieites, J.M., Guazzaroni, M.E., Belouqui, A., Golyshin, P.N., Ferrer, M. (2009). Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 236-255.

- Viggiano, A., Salo, O., Ali, H., Szymanski, W., Lankhorst, P.P., Nygård, Y., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A. (2018). Pathway for the biosynthesis of the pigment chrysogine by *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* **84**, e02246-17.
- Vlasceanu, L., Popa, R., Kinkle, B.K. (1997). Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3123-3127.
- Vlasceanu, L., Sarbu, S.M., Engel, A.S., Kinkle, B.K. (2000). Acidic cave wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol J* **17**, 125-139.
- Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* **55**, 641-658.
- Vojtková, H., Bodorikova, S. (2017). Biomineralisation of silicates by bacterial strains isolated from human skeletal remains. International Multidisciplinary Scientific GeoConference: *SGEM* **17**, 549-554.
- von Neubeck, M., Huptas, C., Gluck, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M. (2017). *Pseudomonas lactis* sp. nov. and *Pseudomonas paralactis* sp. nov., isolated from bovine raw milk. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**, 1656-1664.
- Walsh, F., Duffy, B. (2013). The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PLoS One* **8**, e65567.
- Wandersman, C., Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611-647.
- Wang H, Zheng T, Hill RT, Hu X. (2014). *Permianibacter aggregans* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family *Pseudomonadaceae* capable of aggregating potential biofuel-producing microalgae. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 3503-3507.
- Wang, X., Zhou, H., Chen, H., Jing, X., y col. (2018). Discovery of recombinases enables genome mining of cryptic biosynthetic gene clusters in *Burkholderiales* species. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, E4255-E4263.
- Ward, N., Rainey, F.A., Goebel, B., Stackebrandt, E. (1995). Identifying and culturing the 'unculturables': a challenge for microbiologists. En: Allsopp,

- D., Colwell, R.R., Hawksworth, D.L. (Eds.) Microbial Diversity and Ecosystem Function. Wallingford, United Kingdom, CAB International, 89-110.
- Watve, M., Tichoo, R., Jog, M.M., Bhole, B. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* **176**, 386-390.
- Webster, K., Drobniak, A., Etiope, G., Mastalerz, M., Sauer, P., Schimmelmann, A. (2018). Subterranean karst environments as a global sink for atmospheric methane. *Earth Planet Sci Lett* **485**, 9-18.
- Wegner, C.E., Liesack, W. (2017). Unexpected dominance of elusive *Acidobacteria* in early industrial soft coal slags. *Front Microbiol* **8**, 1023.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**, 697-703.
- Weitnauer, G., Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Westrich, L., Quiros, L.M., Mendez, C., Salas, J.A., Bechthold, A. (2001). An ATP-binding cassette transporter and two rRNA methyltransferases are involved in resistance to avilamycin in the producer organism *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 690-695.
- Wen, Y., Wu, X., Teng, Y., Qian, C., Zhan, Z., Zhao, Y., Li, O. (2011). Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69. *Environ Microbiol* **13**, 2726-2737.
- Weng, M., Pfeifer, O., Krauss, S., Lingens, F., Van Pee, K. (1991). Purification, characterization and comparison of two non-haem bromoperoxidases from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762. *J Gen Microbiol* **137**, 2539-2546.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York, N.Y: Academic Press, Inc., 315-322.
- White, W.B. (2005). Volcanic caves. En: Culvert, D.C., White, W.B. (Eds.) Encyclopedia of Caves. Amsterdam: Elsevier, 599-602.

- White, W.B. (2010). Secondary minerals in volcanic caves: data from Hawai'i. *J Caves Karst Stud* **72**, 75-85.
- Wichmann, F., Udikovic-Kolic, N., Andrew, S., Handelsman, J. (2014). Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *mBio* **5**, e01017.
- Wilson, M.K., Abergel, R.J., Raymond, K.N., Arceneaux, J.E., Byers, B.R. (2006). Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 320-325.
- Wittke, R., Ludwig, W., Peiffer, S., Kleiner, D. (1997). Isolation and characterization of *Burkholderia norimbergensis* sp. nov., a mildly alkaliphilic sulfur oxidizer. *Syst Appl Microbiol* **20**, 549-553.
- Woo, K.S., Choi, D.W., Lee, K.C. (2008). Silicification of cave corals from some lava tube caves in the Jeju Island, Korea: implications for speleogenesis and a proxy for paleoenvironmental change during the Late Quaternary. *Quat Int* **176-177**, 82-95.
- Wood, C. (1976). Caves in rocks of volcanic origin. En: Ford, T.D., Cullingford, C.H.D. (Eds.) The science of speleology. London: Academic Press, 127-150.
- Wu, C., Du, C., Gubbens, J., Choi, Y., Van Wezel, G. (2015). Metabolomics-driven discovery of a prenylated isatin antibiotic produced by *Streptomyces* species MBT28. *J Nat Prod* **78**, 2355-2363.
- Wu, J., Zhou, T., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2014). Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. *Plos One* **9**, e101492.
- Wust, P.K., Foessel, B.U., Geppert, A., Huber, K.J., Luckner, M., Wanner, G., Overmann, J. (2016). *Brevitalea aridisoli*, *B. deliciosa* and *Arenimicrobium luteum*, three novel species of *Acidobacteria* subdivision 4 (class Blastocatellia) isolated from savanna soil and description of the novel family *Pyrinomonadaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 3355-3366.
- Xiao, Y., Li, S., Niu, S., Ma, L., Zhang, G., Zhang, H., Zhang, G., Ju, J., Zhang, C. (2011). Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a tailoring dihalogenase. *J Am Chem Soc* **133**, 1092-1105.

- Xin, B., Zheng, J., Xu, Z., Song, X., Ruan, L., Peng, D., Sun, M. (2015). The *Bacillus cereus* group is an excellent reservoir of novel lanthipeptides. *Appl Environ Microbiol* **81**, 1765-1774.
- Xu, L., Sun, C., Huang, M., Wu, Y.H., Yuan, C.Q., Dai, W.H., Ye, K., Han, B., Xu, X.W. (2019). Complete genome sequence of *Euzebya* sp. DY32-46, a marine *Actinobacteria* isolated from the Pacific Ocean. *Mar Genomics* **44**, 65-69.
- Yamanaka, T. (1995). Changes in organic matter composition of forest soil treated with a large amount of urea to promote ammonia fungi and the abilities of these fungi to decompose organic matter. *Mycoscience* **36**, 17-23.
- Yamazaki, H. (1968). Studies on antimicrobial substance B 44 P (streptovaricin) produced by a strain of actinomycetes. I. Production, extraction and characteristics of substance B 44 P and the identity of the substance with streptovaricin. *J Antibiot (Tokyo)* **21**, 204-208.
- Yang, H.R., Hu, X.P., Jiang, C.J., Qi, J., Wu, Y.C., Li, W., Zeng, Y.J., Li, C.F., Liu, S.X. (2015). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Cephalotaxus hainanensis* Li, a well-known medicinal plant in China. *Lett Appl Microbiol* **61**, 484-490.
- Yang, X., Huang, E., Yousef, A. (2017). Brevibacillin, a cationic lipopeptide that binds to lipoteichoic acid and subsequently disrupts cytoplasmic membrane of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res* **195**, 18-23.
- Yarza, P., Yilmaz, P., Priesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* **12**, 635-645.
- Yasir, M. (2017). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Braz J Microbiol* **49**, 248-257.
- Yergeau, E., Bell, T.H., Champagne, J., Maynard, C., Tardif, S., Tremblay, J., Greer, C.W. (2015). Transplanting soil microbiomes leads to lasting effects on willow growth, but not on the rhizosphere microbiome. *Front Microbiol* **6**, 1436.

- Yin, Q., Zhang, L., Song, Z.M., Wu, Y., Hu, Z.-L., Zhang, X.H., Zhang, Y., Yu, M., Xu, Y. (2018). *Euzebya rosea* sp. nov., a rare actinobacterium isolated from the East China Sea and analysis of two genome sequences in the genus *Euzebya*. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**, 2900-2905.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**, 1613-1617.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1271-1272.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., Nakamura, S. (1991). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 1647-1650.
- Yoshida, H., Yamamoto, K., Murakami, Y., Katsuta, N., Hayashi, T. (2008). The development of Fe-nodules surrounding biological material mediated by microorganisms. *Environ Geol* **55**, 1363.
- Youssri, M. A., Ibtihaj, J.J. (2018). A novel antioxidant and antimicrobial compound produced by *Bacillus Firmicutes*. *Biomed Res* **29**, 2246-2253.
- Yu, D., Xu, F., Zeng, J., Zhan, J. (2012). Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. *IUBMB Life* **64**, 285-295.
- Yücel, S., Mustafa, Y. (2010). Selection of *Streptomyces* isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms. *Pak J Pharm Sci* **23**, 1-6.
- Zaitlin, B., Watson, S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res* **40**, 1741-1753.
- Zepeda Mendoza, M.L., Lundberg, J., Ivarsson, M., Campos, P., Nylander, J.A., Sallstedt, T., Dalen, L. (2016). Metagenomic analysis from the interior of a speleothem in Tjuv-Ante's Cave, Northern Sweden. *PloS one* **11**, e0151577.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis A. (2014). PEAR: A Fast and Accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* **30**, 614-620.

- Zhang, L., Shi, J., Liu, C., Xiang, L., Ma, S., Li, W., Jiao, R.H., Tan, R.X., Ge, H.M. (2018). New borrelidin derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. *Tetrahedron Lett* **59**, 4517-4520.
- Zhang, Q., Cone, M.C., Gould, S.J., Zabriskie, T.M. (2000). Reevaluation of the final steps in the biosynthesis of blasticidin s by *Streptomyces griseochromogenes* and identification of a novel self-resistance mechanism. *Tetrahedron* **56**, 693-701.
- Zhang, Q., Sun, J., Liu, S., Wei, Q. (2013). Manure refinement affects apple rhizosphere bacterial community structure: a study in sandy soil. *PLoS One*. **8**, e76937.
- Zhang, X., Xu, W., Liu, Y., Cai, M., Luo, Z., Li, M. (2018). Metagenomics reveals microbial diversity and metabolic potentials of seawater and surface sediment from a hadal biosphere at the Yap Trench. *Front Microbiol* **9**, 2402.
- Zhang, Z.F., Liu, F., Zhou, X., Liu, X.Z., Liu, S.J., Cai, L. (2017). Culturable mycobiota from karst caves in China, with descriptions of 20 new species. *Persoonia* **39**, 1-31.
- Zhao, B., Guengerich, F.P., Bellamine, A., Lamb, D.C., y col. (2005). Binding of two flaviolin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) cytochrome P450 158A2. *J Biol Chem* **280**, 11599–11607.
- Zhao, G.Z., Li, J., Huang, H.Y., Zhu, W.Y., Zhao, L.X., Tang, S.K., Xu, L.H., Li, W.J. (2011). *Pseudonocardia artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Artemisia annua* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1061-1065.
- Zhao, R., Wang, H., Yang, H., Yun, Y., Barton, H.A. (2017). Ammonia-oxidizing archaea dominate ammonia-oxidizing communities within alkaline cave sediments, *Geomicrobiol J* **34**, 511-523.
- Zhong, C., Cao, G., Rong, K., Xia, Z., Peng, T., Chen, H., Zhou, J. (2018). Characterization of a microbial polysaccharide-based bioflocculant and its anti-inflammatory and pro-coagulant activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* **161**, 636-644.

- Zhou, J., Gu, Y., Zou, C., Mo, M. (2007). Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China. *J Microbiol* **45**, 105-112.
- Zhou, T., Komaki, H., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Sato, S., Igarashi, Y. (2015). Biosynthesis of akaeolide and lorneic acids and annotation of type I polyketide synthase gene clusters in the genome of *Streptomyces* sp. NPS554. *Mar Drugs* **13**, 581-596.
- Zimmermann, J., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. (2006). Epilithic biofilms in Saint Callixtus Catacombs (Rome) harbour a broad spectrum of *Acidobacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**, 203.

Enlaces, direcciones de internet y otras referencias:

- Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Schaffer, A. (2012). Nanopore Sequencing. MIT Technology Review. April, 25. <http://www2.technologyreview.com/news/427677/nanopore-sequencing/>
- Brauer D., Bartsch K., Donn G 17, Nov. 1988. Gene resistant to phosphinothricin. Patent number EP0290986.
- <http://blog.mothur.org/2014/09/11/Why-such-a-large-distance-matrix/>
- <http://www.bacterio.net/>
- Motitschke, L., Driller, H., Galinski, E.A. May 2000. Ectoin and ectoin derivatives as moisturizer in cosmetics. U.S. patent US6060071.
- UniProt Consortium (2018). "UniProt version 2018-01 released on 2018-01-31." Database.
- Yasuhiko, Y., Yoshio, K., Eiichiro, K., Yasuhiro, T., Seichi, S. 21, October 1997. Production of l-amino acid by fermentation method using ectoine. Japanese patent JP9271382.

FE DE ERRATAS:

- En las páginas 120, 142, 151, 155 y 161, en lugar de *Burkholderiales bacterium*, debe poner *Piscinibacterium candidicorallinum*.
- En la página 125, en lugar de *Candidatus Nitrosotalea devanaterrea* (LN890280) y *Candidatus Nitrosopelagicus brevis* (CP007026), debe poner *Nitrosopumilus maritimus* (NR_102913).
- En la página 126, segundo párrafo, donde dice “Así, se utilizaron 63 clones para la construcción de esta librería”, debe decir “Así, se utilizaron 65 clones para la construcción de esta librería”
- En la página 152, segundo párrafo, donde dice “Otros OTUs presentaron una estrecha relación con microorganismos con metabolismo muy dispar, como *Methylocapsa* y *Methyloirabilisya*”, debe decir “Otros OTUs presentaron una estrecha relación con microorganismos con metabolismo muy dispar, como *Methylocapsa* y *Methylovirgula*”.
- En la página 174, segundo párrafo, donde dice “en el caso de la generación de lecturas de 300 pares de bases el cribado de datos ha variado entre el 80,49% y el 37,07% del total.”, debe decir “en el caso de la generación de lecturas de 300 pares de bases el cribado de datos ha variado entre el 80,49% y el 62,93% del total.”.
- En la página 195, donde dice “aislamiento e identificación taxonómica final de un total de 27 bacterias (Fig. 4.1 y Tablas 4.1 y 4.2). En términos absolutos, el filo Actinobacteria se presentó como el grupo más representativo, con 13 cepas aisladas, seguido de Proteobacteria con 10. Menos representativo apareció el filo Firmicutes con cuatro cepas aisladas.”, debe decir “aislamiento e identificación taxonómica final de un total de 26 bacterias (Fig. 4.1 y Tablas 4.1 y 4.2). En términos absolutos, el filo Actinobacteria se presentó como el grupo más representativo, con 13 cepas aisladas, seguido de Proteobacteria con 10. Menos representativo apareció el filo Firmicutes con tres cepas aisladas.”.

- En la página 197, 198 y 207, en lugar de ***Pseudoarthrobacter***, debe poner ***Pseudarthrobacter***.
- En la página 204, segundo párrafo, donde dice “pero muy común en cuevas (**ver tesis de Irene**)”, debe poner “pero muy común en cuevas (**Dominguez-Monino, Tesis, 2015**)”.